

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PAPEL DE LA RUTA JAK2 /STAT EN LA SUPERVIVENCIA
ENDOTELIAL FRENTE A MUERTE POR DESARRAIGO Y
POR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

FERNANDO NERIA SERRANO
Madrid, 2007

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

PAPEL DE LA RUTA JAK2/STAT EN LA SUPERVIVENCIA
ENDOTELIAL FRENTE A MUERTE POR DESARRAIGO Y
POR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

TESIS DOCTORAL

Fernando Neria Serrano
Licenciado en Biología

Directores: Dr. Carlos Caramelo Díaz y Dra. M^a Ángeles Castilla Moro
Laboratorio de Nefrología e Hipertensión
Fundación Jiménez Díaz

Don Carlos Caramelo Díaz, Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Doña M^a Ángeles Castilla Moro, Doctora en Ciencias Biológicas,

CERTIFICAN

Que Don Fernando Neria Serrano, Licenciado en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Papel de la ruta JAK2/STAT en la supervivencia endotelial frente a muerte por desarraigo y por especies reactivas de oxígeno” que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid, a 2 de Abril de 2007

Dr. Carlos Caramelo Díaz

Dra. M^a Ángeles Castilla Moro

La ciencia se compone de errores, que a
su vez, son los pasos hacia la verdad

Julio Verne

A mi tío Dado

(Si no es por él, ahora no sería biólogo)

Llegó el momento de dar las gracias; pero antes que nada, quisiera decir algo muy mío:

NOHPN

(Alguno ya lo entendéis)

Bromas aparte, espero no olvidar a nadie que haya echado una mano (o dos) en estos cinco años.

- Al Dr. Carlos Caramelo, por haberme guiado durante todo este tiempo para conseguir este “tocho” y por permitir que haya continuado en el Labo sin más preocupaciones que seguir haciendo lo que me gusta.
- A la Dra. M^a Ángeles Castilla (alias: MAC o Dra Maligna). Sin tu ayuda y dedicación, esta tesis no habría salido adelante. Parte de esta tesis es tuya.
- A la Fundación Conchita Rábago, que me concedió la beca (allá por 2002) que ha permitido la realización de esta tesis. Gracias especialmente a Marta: siempre había algún caramelito para recargar las pilas cuando subía cada final de mes.
- Al personal de la Fundación Jiménez Díaz que ha puesto su granito de arena en este pequeño montón. Muy especialmente a: Lola, Choni y Loli (Diálisis), Vanesa (Investigación), Dr. Félix Manzarbeitia (Anatomía Patológica), Encarna y Régula (Auxiliares), Curra (Lab. Isótopos y Micr. Confocal), Auxiliares del animalario.
- A los operarios de los mataderos Gypisa y Nombela, por todas las aortas que nos han dado.
- A Héctor Peinado y Amparo Cano por la ayuda con los plásmidos de β -catenina y a Dwayne Barber por los plásmidos de JAK2.
- A todos mis compañeros de Labo (los que estáis y los que ya os habéis marchado): Lara, Sonso, Susi, Mariví, Mentxu, Fran, Olalla, Ruth (alias: ¿Y por qué?). En especial, gracias a Alai (alias: Nenaza; ¡Que vicios que nos echábamos!), a Juanjo (alias: Pollo; QTD a ti también) y Silvia (alias: Pitufitécnica; YET en tomarnos un café). Estos cinco años habrían sido un coñazo sin vuestra presencia y una pesadilla sin vuestra ayuda.

- A las chicas de la Complu: Eva y María. Al final, el autista no lo era tanto. En palabras de MAC: “Al menos salió algo de nuestra colaboración”.
- A toda la gente de los Laboratorios vecinos que han ayudado (aunque sólo sea no lesionándome cuando jugábamos al baloncesto o al fútbol): Mati (Microbiología), Raúl, Juanan, David, Vero (Fisiopatología ósea), Bea (Lípidos), Verónica, Nieves, Alicia (Metabolismo, nutrición y hormonas), Jose y Cristina (Neurología), Bea, Charlie, Gemma, Elena, Alex, Patri (Inmunología), Jon, M^a Ángeles, Bego Julio, Van, Alberto, Guada, Mónica, Oscar, Bea, Marina (Nefrología Experimental). Seguro que olvido a alguien; no ha sido mi intención.

Aparte de todo lo que tiene que ver con el desarrollo de esta tesis, mucha gente de fuera me ha ayudado y apoyado durante este tiempo:

- A mi familia (Fernando, Pepi, Isa y Cris), por continuar soportándome en casa (espero que ya quede poco).
- A mis amigos del PORTAL 4 (Ángel, Arsenio, Carol, Chus, Fer, Jesús, Jesúsín, Luke, Oscar, Pablo, Pedro, Rubén), por bajar todos los días a arreglar el mundo durante una horita. No quiero olvidarme de la gente de Plasencia: Alberto, Ángel, Manolo, Mamen y María, por darme su apoyo durante los fines de semana. Por último, a Jorge, por ser tan clon.
- A Ana y Ángeles, por “cuidar de mí” durante los años de la Facultad. No me olvido de vosotras.
- A Eva. Has sido capaz de soportar todas mis neuras y quererme tal como soy. Has sido el apoyo principal que he tenido durante la redacción de esta tesis. Por esto y por todo lo demás, GRACIAS.

RESUMEN:

El microambiente tumoral y los factores angiogénicos, cuyo paradigma es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), ejercen efectos citoprotectores sobre las células endoteliales (CE) en monocapa. Sin embargo, no se conocen sus acciones biológicas sobre CE que se desprenden de la monocapa. Los mecanismos implicados en la protección por medio condicionado tumoral (MC) incluyeron tanto las rutas de supervivencia PI3K/Akt y MAPK como la inhibición de caspasa 3. Esta protección se prolongó cuando las CE se desarraigaron y se cultivaron en suspensión. El efecto protector del VEGF en monocapa se convirtió en citotóxico al romperse las uniones. Este efecto es específico de VEGF, dependiente de ambos receptores de VEGF y mediado por PI3K/Akt. En base a la literatura previa, estudiamos la importancia de β -catenina en el desarraigo, observándose una disminución de muerte cuando β -catenina estaba aumentada. La inhibición de la ruta JAK2/STAT protegió a las CE de la muerte por desarraigo y mejoró su capacidad de resiembra, implicando al eje PI3K/Akt-GSK3 β - β -catenina. Los cambios inducidos por el pretratamiento inhibidor de JAK2 confirmaron la importancia de β -catenina, al observarse cambios funcionales de la misma. Conocida la participación de JAK2 en la respuesta a estrés oxidativo por especies reactivas de oxígeno (ROS), comprobamos que la inhibición de JAK2, tanto farmacológica como mediante dominante negativo de JAK2, protege de la exposición a ROS, por mecanismos que incluyen el aumento del ratio Bcl2/Bax y la inhibición de caspasa 3. En un modelo experimental *in vivo*, la inhibición de JAK2 protegió a las CE de capilares peritubulares frente al daño oxidativo producido por ciclosporina A. Nuestros datos mostraron la importancia de la inhibición de JAK2 en el daño endotelial, sugiriendo la posible utilidad de su empleo durante el trasplante renal o para procesos de reendotelización a partir de CE adultas.

SUMMARY:

Tumor microenvironment and angiogenic factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF) as a paradigm, exert cytoprotective effects on monolayer endothelial cells (EC). However, the biological actions of these factors on EC detached from the monolayer are largely unknown. Mechanisms involved on tumor conditioned medium (CM) protection are survival pathways PI3K/Akt and MAPK and inhibition of caspase 3. This protection went on when EC were detached and cultured in suspension. The cytoprotective effect of VEGF on monolayer EC reverted to cytotoxic on detached conditions. This effect was specific of VEGF, dependent of both VEGF receptors and mediated by PI3K/Akt. Based on previous literature, the role of β -catenin in detached conditions was studied, showing protective effects as β -catenin was increased. The JAK2/STAT pathway inhibition protected EC against detachment induced death and increased reseeding efficacy. This effect involved PI3K/Akt-GSK3 β - β -catenin-mediated pathways. Changes observed by inhibiting JAK2 confirmed β -catenin influence. We also studied JAK2 inhibition (pharmacologic or dominant negative form of JAK2), based on its known importance in oxidative stress response against reactive oxygen species (ROS). Results showed that JAK2 inhibition protects EC against ROS exposure, involving increased Bcl2/Bax ratio and caspase 3 inhibition. An experimental *in vivo* model revealed protective effect of JAK2 inhibition against cyclosporine A-oxidative induced injury on peritubular capillaries EC. These results illustrated the influence of JAK2 inhibition on endothelial injury, suggesting the possible utility of its use during kidney transplant or reendothelization from adult EC.

Abreviaturas	1
1. Introducción	4
1.1. El endotelio	5
1.1.1. Características	5
1.1.2. ¿Cómo está dispuesto el endotelio?	6
1.1.3. Funciones	7
1.2. Muerte celular inducida por pérdida de uniones : Anoikis	8
1.2.1. Señales desde las uniones célula-matriz extracelular	10
1.2.2. Señales desde las uniones célula-célula	10
1.2.3. Mecanismos de ejecución de la muerte celular	10
1.3. El complejo cadherina- β -catenina	11
1.4. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)	13
1.4.1. Familia de VEGF	14
1.4.2. Receptores de VEGF	15
1.4.3. Regulación de la expresión génica de VEGF	15
1.4.4. Señalización por VEGF y sus efectos sobre el endotelio	16
1.5. La ruta JAK/STAT	17
1.5.1. Señalización y efectos	18
1.5.2. Inhibición de JAK/STAT	19
2. Objetivos	21
3. Materiales y métodos	23
3.1. Cultivos Celulares	24
3.1.1. Obtención y cultivo primario de células endoteliales (CE)	24
3.1.2. Cultivo de MG63 y preparación de medio condicionado (MC)	24
3.1.3. Transfección de CE	25
3.2. Maniobras de daño endotelial	26
3.2.1. Cultivo en ausencia de suero	26
3.2.2. Estrés oxidativo	26
3.2.3. Cultivo en suspensión	27
3.3. Citometría de flujo	28

3.4.	Ensayo de resiembra sobre Matrigel	28
3.5.	Ensayo de actividad de la caspasa 3	29
3.6.	Ensayo de citotoxicidad mediante liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)	29
3.7.	Análisis de proteínas	29
3.7.1.	Extracción de proteínas	29
3.7.2.	Western Blot	30
3.7.3.	Ensayo de retardo en movilidad electroforética	31
3.8.	Ensayo de actividad de β -catenina/TCF (TOP/FOP)	32
3.9.	Ensayo de fragmentación del ADN	32
3.10.	Microscopía confocal	33
3.10.1.	Inmunofluorescencia	33
3.10.2.	Medida del estado oxidativo mediante dihidrorodamina 123	33
3.11.	Estudios <i>in vivo</i>	34
3.12.	Datos estadísticos	34
3.13.	Productos y casas comerciales	35
3.13.1.	Reactivos	35
3.13.2.	Medios de cultivo o incubación	36
3.13.3.	Kits comerciales	37
3.13.4.	Isótopos	37
3.13.5.	Tampones y soluciones	37
4.	Resultados	38
4.1.	Análisis de mecanismos inducidos por el MC de MG63	39
4.2.	Efecto del MC de MG63 sobre la supervivencia endotelial frente a muerte por desarraigo	40
4.3.	Efecto del VEGF sobre la supervivencia endotelial frente a muerte por desarraigo	42
4.3.1.	Inhibición de PI3K/Akt	44
4.3.2.	Inhibición de GSK3 β	45

4.3.3.	Inhibición de JAK2/STAT	46
4.4.	Efecto del AG490 sobre la muerte por desarraigo	48
4.4.1.	Estudio de mecanismos: Protección por AG490	50
4.5.	Efecto del AG490 en otros modelos de daño endotelial	52
4.5.1.	Protección frente a la ausencia de suero	52
4.5.2.	Protección frente a estrés oxidativo	54
4.5.3.	Estudio <i>in vivo</i> de la protección frente a estrés oxidativo	59
5.	Discusión	61
6.	Conclusiones	77
7.	Bibliografía	80
8.	Anexos	96

Ac: Anticuerpo
ADN: Ácido desoxiribonucleico
APC: Adenomatous polyposis coli
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
ATP: Adenosina trifosfato
BSA: Albúmina de suero bovino
Ca²⁺: Calcio
CE: Célula endotelial
CsA: Ciclosporina A
DMSO: Dimetilsulfóxido
DPBS: Solución salina tamponada con fosfatos de Dulbecco
ECL: Quimioluminiscencia
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
EGF: Factor de crecimiento epitelial
EMSA: Ensayo de retardo en movilidad electroforética
eNOS: NO sintasa endotelial
ERK: Quinasa regulada por señales extracelulares
FAK: Quinasa de adhesión focal
FC: Factores de crecimiento
FGF: Factor de crecimiento fibroblástico
GAS: Sitio activado por interferón gamma
G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos
GSK3: Glucógeno sintetasa quinasa 3
HIF-1: Factor inducido por hipoxia 1
HRE: Elementos de respuesta a hipoxia
HRP: Peroxidasa de rábano
HX: Hipoxantina
i.p.: Intraperitoneal
IAP: Inhibidores de apoptosis

Ig: Inmunoglobulina
ILK: Quinasa ligada a integrina
IP: Ioduro de propidio
JAK: Quinasa Janus
JNK: c-Jun N-Terminal quinasa
Kd: Constante de disociación
Kda: Kilodalton
LDH: Lactato deshidrogenasa
LEF/TCF: Factor potenciador linfoide/factor de células T
LRP: Proteína ligada al receptor de lipoproteína
MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MC: Medio condicionado tumoral de MG63
MEM D-Val: Medio mínimo esencial con D-Valina
MF: Medio fresco
min: Minutos
NO: Óxido nítrico
Nrp-1: Neuropilina
oxLDL: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PECAM-1: Molécula de adhesión plaqueta/célula endotelial 1
PGI₂: Prostaciclina
PI3K: Fosfatidil inositol 3´ quinasa
PKB/Akt: Proteína quinasa B/Akt
PKC: Proteína quinasa C
PIGF: Factor de crecimiento placentario
Poly-HEMA: Poly-2-hidroxietilmetacrilato
PTEC: Células epiteliales de túbulo proximal
PTEN: Fosfatasa y homólogo de tensina eliminado del cromosoma 10
RNasa: Ribonucleasa
ROS: Especies reactivas de oxígeno

rpm: Revoluciones por minuto

s.c.: Subcutánea

SDS: Dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

STAT: Proteínas Transductoras de señales y activadoras de la transcripción

t^a: Temperatura

TGF: Factor de crecimiento transformante

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGFR: Receptor de VEGF

XO: Xantina oxidasa

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la fisiología y fisiopatología endotelial es un elemento clave de interpretación para comprobar el mecanismo de numerosas enfermedades, que abarcan patologías tan diferentes como los trastornos circulatorios, las inflamatorias o los tumores malignos. El interés por el papel del endotelio en diversos procesos ha crecido sustancialmente desde la identificación de nuevas propiedades y alteraciones funcionales a finales de la década de los 80. Sin embargo, a pesar de la enorme cantidad de información disponible, persisten sin aclarar aspectos fundamentales de la biología celular y molecular del endotelio. Esta tesis trata de una serie de estos aspectos previamente no descritos.

1.1. El endotelio

1.1.1. Características

El endotelio es la monocapa de células que tapiza internamente los vasos sanguíneos y, por tanto, separa la sangre del resto de tejidos. Si bien en los capilares es el único tejido que se interpone entre la sangre y el intersticio, en los grandes vasos (arterias y venas) además interacciona con otros tejidos (músculo liso, fibroblastos). El endotelio es capaz de sintetizar, almacenar y liberar moléculas especiales que inciden en el funcionamiento normal de órganos diferentes y cumple una función de almacenamiento de sustancias producidas por él mismo y por otros tipos celulares. Por estas razones, al endotelio se le puede considerar un órgano, aunque de distribución extensa.

La monocapa endotelial esta constituida exclusivamente por células endoteliales (CE), que contactan con una membrana basal de matriz extracelular generada por las propias CE, pero que permite el contacto con la capa íntima y media de los vasos sanguíneos. Es característica de las CE organizadas en las grandes arterias, la presencia de los cuerpos de Weibel-Palade, unos orgánulos que acumulan Factor VIII y P-selectina; la presencia de Factor VIII puede emplearse para caracterizar a las CE, tanto *in vivo* como *in vitro*.

1.1.2. ¿Cómo esta dispuesto el endotelio?

La estructura en monocapa se mantiene gracias a las distintas uniones que permiten a la CE mantener su lugar y forma dentro del tejido. En el endotelio, los tipos de uniones más destacados son las uniones célula-célula y las uniones célula-matriz extracelular, cada una de ellas mediada por moléculas especializadas. La abundancia de unas u otras, y la expresión de moléculas de adhesión en la superficie determinarán la permeabilidad de un determinado endotelio y sus propiedades respecto a las células con las cuales establece contacto, como otras CE, células de la sangre, de músculo liso vascular y mesangio. En este punto y antes de referirnos a cada unión específica, introduciremos un concepto fundamental concerniente a las uniones y la supervivencia celular. Así, las CE, como otras múltiples células de localización fijada genéticamente, utilizan las uniones no sólo como anclaje sino también como un sistema de recogida permanente de información. Puede decirse que es a través de unión con las otras células y con la matriz, la CE “ve” lo que la rodea. En este sentido, se ha acuñado el término de “hard wired state” como imagen para describir este estado de alta conexión y tráfico de información a través de sensores proteicos distribuidos en la superficie y el citoesqueleto de CE.

- **Uniones célula-célula:** Se realizan a través de uniones homofílicas de cadherinas dependientes de Ca^{2+} . Las cadherinas son glicoproteínas transmembrana cuya región extracelular se asocia con otras cadherinas de las células adyacentes y su región citoplásmica interacciona con diversas proteínas de la familia Armadillo, como β -catenina o plakoglobina, a través de las cuales se conecta con los microfilamentos de actina del citoesqueleto. Las uniones mediadas por cadherinas generalmente se agrupan en diferentes partes de la célula formando las uniones adherentes (98). Existen distintos tipos de cadherinas, si bien en el endotelio se expresan solo unos tipos concretos: N-cadherina, P-cadherina, VE-cadherina (específica del endotelio vascular). En un principio se asoció exclusivamente a la VE-cadherina con la unión CE-CE; sin embargo, en la actualidad se sabe que están implicadas en desarrollo vascular, permeabilidad vascular, angiogénesis, trans migración de leucocitos e inhibición por contacto (10;26;27).

- **Uniones célula–matriz extracelular:** Se realizan a través de las integrinas. Es una gran familia de glicoproteínas de superficie celular que actúan como receptores de los componentes de la matriz extracelular. Estos sitios de unión integrinas–matriz extracelular se conocen como contactos focales (98). La estructura de las integrinas es heterodimérica, con una subunidad α y una subunidad β , unidas mediante enlaces no covalentes. Hasta el momento se han descrito 18 subunidades α y 8 subunidades β , que se asocian para formar hasta 24 heterodímeros diferentes (103). Al igual que las cadherinas, el dominio citoplásmico de las integrinas se une con el citoesqueleto de actina mediante proteínas adaptadoras. Algunas de éstas presentan actividad quinasa, como la quinasa de contactos focales (Focal Adhesion Kinase, FAK) y la quinasa ligada a integrina (Integrin–Linked Kinase, ILK), e inician cascadas de señalización. Algunas de las funciones en las que están implicadas las integrinas son la adhesión celular estable, migración, supervivencia, proliferación y diferenciación. Muchos de estos efectos son los mismos que los que activan los receptores de factores de crecimiento. Se cree que este hecho puede proporcionar un aumento de la especificidad y un control sobre mayor número de procesos celulares (102).

Cabe destacar que existen otros tipos de uniones mediadas por otros receptores de adhesión, que asocian a las CE con otras células, como pericitos o células del músculo liso vascular. Se trata de uniones lábiles, de recambio rápido, no estructurales y destinadas fundamentalmente a fijar células circulantes a la superficie endotelial. Así, existen las uniones por moléculas de adhesión celular–inmunoglobulina (Ig–CAM). En el endotelio, algunas de estas proteínas tienen un papel importante en el paso de los leucocitos hacia el tejido inflamado. En este grupo destaca PECAM–1 o CD31. Su dominio citoplásmico está anclado con los filamentos de actina mediante β y γ –catenina y participa no solo en la adhesión sino también en procesos de protección endotelial (41).

1.1.3. Funciones

El endotelio responde a estímulos diversos, desde hormonas a factores de crecimiento, así como a especies reactivas de oxígeno (ROS) que se producen en

relación con el proceso respiratorio y con mayor intensidad en la isquemia/reperfusión. En condiciones normales, las ROS son una parte relevante de la señalización sobre el endotelio, por ejemplo en su relación con las células de la sangre. En determinadas circunstancias, como la activación de leucocitos o el incremento de la presión en el interior del vaso, el endotelio se encuentra en lo que se denomina genericamente como “estrés”, y más específicamente, como “estrés oxidativo”, al ser corriente que los mecanismos estresantes se traduzcan en un incremento, a veces extremo, de ROS.

Entre otras funciones fisiológicas, el endotelio participa en la regulación de la presión sanguínea y de la homeostasis hemodinámica, interacciona con el sistema inmune y en particular con el complemento, expresa receptores y presenta antígenos para la respuesta inmune.

Por último, el endotelio es el tejido encargado de la formación de nuevos vasos a partir de CE de vasos preexistentes, en el proceso conocido como angiogénesis. Si bien la angiogénesis no es frecuente en individuos adultos, si lo es en diversas patologías, como la angiogénesis tumoral y retinopatías proliferativas y neovascularización en general. En éstas se produce una gran cantidad de nuevos vasos por desregulación del balance entre factores angiogénicos y factores angioestáticos.

1.2. Muerte celular inducida por pérdida de las uniones: Anoikis

La gran mayoría de las células que constituyen los órganos se encuentran genéticamente programadas para sobrevivir exclusivamente asociadas a la matriz extracelular y a las células adyacentes. Tan sólo las células de la sangre están programadas para poder sobrevivir sin asociación alguna. El desarraigo de las células (por diversas causas) de sus células vecinas y/o la matriz extracelular detiene la continua llegada de información proveniente de las uniones, generando una señal que inicia un proceso de muerte celular. La naturaleza de esta señal es desconocida, e incluso podría tratarse simplemente de una ausencia de señal de arraigo.

La pérdida de las uniones celulares es un potente estímulo para desencadenar la muerte celular programada (apoptosis). En 1994, Steven M. Frisch y Hunter Francis

describieron, por primera vez, la inducción de la apoptosis en células epiteliales por rotura de las uniones celulares y denominaron a este fenómeno anoikis, un término griego que significa “sin hogar” (an-oikos) (38). Se trata de un fenómeno descrito en una gran variedad de tipos celulares, incluyendo fibroblastos, células endoteliales, células epiteliales, neuronas, queratinocitos y células de los islotes pancreáticos.

El estudio de la anoikis ha adquirido mayor importancia con los hallazgos de señales de supervivencia provenientes de las uniones celulares. Se han descrito casos de anoikis en procesos de mantenimiento de la homeostasis y durante el desarrollo. Un claro ejemplo tiene lugar en las células epiteliales intestinales, que mueren por anoikis tras la pérdida de uniones con la superficie luminal de las crestas intestinales (49). Sin embargo, es en procesos patológicos donde la sensibilidad o resistencia frente a anoikis adquieren un papel crítico. Como ejemplo, en células tumorales, uno de los requisitos fundamentales para que ocurra una transformación metastática es la adquisición de resistencia frente a anoikis, es decir, ser capaces de sobrevivir en ausencia de uniones celulares (30;113).

Quedan, sin embargo, múltiples aspectos relativos a la anoikis que permanecen aún sin resolver, como la importancia del preconditionamiento anterior a la pérdida de las uniones; la actuación de factores de crecimiento, la inducción/represión de la expresión de genes o la activación/inhibición de rutas de señalización celular, que produce cambios que pueden desembocar en un aumento o disminución en la sensibilidad frente a anoikis. Estos hallazgos adquieren su importancia práctica en procesos tan diversos como las metástasis tumorales o el potencial de reendotelización a partir de CE desprendidas. Un punto de particular interés investigacional es la definición, aún no realizada, de los mecanismos que determinan que la muerte por desarraigo ocurra por apoptosis o necrosis.

La dificultad en el estudio de la anoikis reside en la gran variedad de interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular que cada tejido presenta, ya que cada uno de los tipos de uniones celulares genera potencialmente un conjunto de señales de supervivencia; por esta razón, es de esperar que los resultados obtenidos en un tipo celular no puedan ser extrapolados a otro tipo o al mismo tipo celular pero en un microambiente distinto (47). Sin embargo, algunos aspectos relativos al

mecanismo de la anoikis sí pueden generalizarse. En este trabajo, hemos empleado el término “muerte por desarraigo” para referirnos a este fenómeno de forma genérica. El término “anoikis” queda para indicar específicamente la forma apoptótica de esta muerte.

1.2.1. Señales desde las uniones célula–matriz extracelular

La unión de las integrinas con sus ligandos de la matriz genera en el interior celular señales de supervivencia, en su mayoría iniciadas por las dos quinasas asociadas a las integrinas: FAK e ILK. Se ha descrito que tras la unión de las integrinas con sus ligandos, estas quinasas son capaces de activar las rutas de supervivencia PI3K/Akt (53), ERK (60;68) y JNK–MAPK (4). Los ejemplos más claros de esta implicación son aquellos en los que la sobreexpresión de FAK o ILK constitutivamente funcionales bloquea la anoikis, mientras que la expresión de mutantes negativos o la transfección con secuencias antisentido induce la anoikis aún en condiciones óptimas de adhesión celular (6;39).

1.2.2. Señales desde las uniones célula–célula

Las cadherinas forman las uniones célula–célula pero también son capaces de transducir señales de supervivencia. Por ejemplo, se ha descrito la asociación de la cascada de señalización PI3K con las cadherinas (11), así como con la ILK, pudiéndose considerar a esta quinasa como el enlace entre señalización célula–célula y señalización célula–matriz extracelular.

En la señalización desde las cadherinas, la β -catenina asociada en el dominio citoplásmico tiene un papel muy importante, puesto que, como se describirá más adelante, puede actuar como factor de transcripción para la expresión de diversos genes (ver apartado 1.3 de Introducción).

1.2.3. Mecanismos de ejecución de la muerte celular

Diversos estudios han descrito el papel de las proteínas de la familia de Bcl2 en el proceso de anoikis. Por ejemplo, se han descrito casos de bloqueo de la anoikis en

modelos *in vitro* donde se sobreexpresa Bcl-2 (39); igualmente, se ha observado una disminución de la proteína antiapoptótica Bcl-X_L durante la anoikis (99).

El papel de ejecutor final de la anoikis, como proceso apoptótico, lo ejercen las caspasas, puesto que el empleo de inhibidores de amplio espectro de caspasas es capaz de bloquear la anoikis. Sin embargo, es difícil determinar una cascada de caspasas que se adapte a todos los modelos, dadas las diferentes implicaciones de unas rutas u otras en cada modelo (47). En la actualidad, los modelos muestran que, si bien son muchas las proteínas que sufren proteólisis inducida por caspasas, algunas forman parte de las rutas de supervivencia mediadas por el anclaje celular: Akt (8), FAK (48), β -catenina (112).

En ciertas circunstancias, se ha descrito la implicación de ROS en procesos apoptóticos (117;119). Sin embargo, sobre el papel de ROS en la anoikis poco se conoce; Li y cols describieron un aumento de ROS en CE humanas cultivadas en suspensión así como una disminución de la anoikis cuando se pretrataba con agentes antioxidantes (70). Aún así, queda por determinar el papel en la anoikis de vías de señalización celular capaces de reducir la producción intracelular de ROS.

1.3. El complejo cadherina – β -catenina

La β -catenina se encuentra, como ya se ha descrito, asociada al dominio citoplásmico de las cadherinas y liga, mediante α -catenina, las uniones célula-célula con el citoesqueleto. Esta β -catenina puede soltarse de la cadherina, quedando libre en el citoplasma, donde se asocia en un complejo con axina, APC (adenomatous polyposis coli) y GSK3 β (glucógeno sintetasa quinasa 3 β). Esta quinasa, que en estado no estimulado de la célula es activa, fosforila a β -catenina, lo que provoca que β -catenina pueda ser ubiquitinada y se degrade por el proteasoma. Además, la fosforilación retiene a la β -catenina en el citoplasma, favoreciendo su degradación e impidiendo su translocación al núcleo y, por lo tanto, su acción como factor de transcripción (Figura 1). Los mecanismos referidos mantienen bajos los niveles de β -catenina libre en el citoplasma (84).

Existen distintos estímulos que evitan que β -catenina se degrade. La ruta clásica que permite la no degradación de β -catenina es la señalización por Wnt. Las Wnts son proteínas modificadas con lípidos que intervienen en muchos procesos del desarrollo y actúan a través de dos moléculas receptoras: Frizzled y LRP-5/6 (lipoprotein receptor–ligated protein 5 y 6). La activación de la señalización por Wnt produce la inactivación de GSK3 β por fosforilación. La β -catenina no fosforilada queda libre en el citoplasma y puede translocarse y entrar al núcleo, donde se une a la familia de factores de transcripción LEF/TCF (lymphoid enhancer factor/T-cell factor) e induce la expresión de genes (21), entre ellos algunos implicados en la proliferación (115) y la adhesión celular (46) (Figura 1).

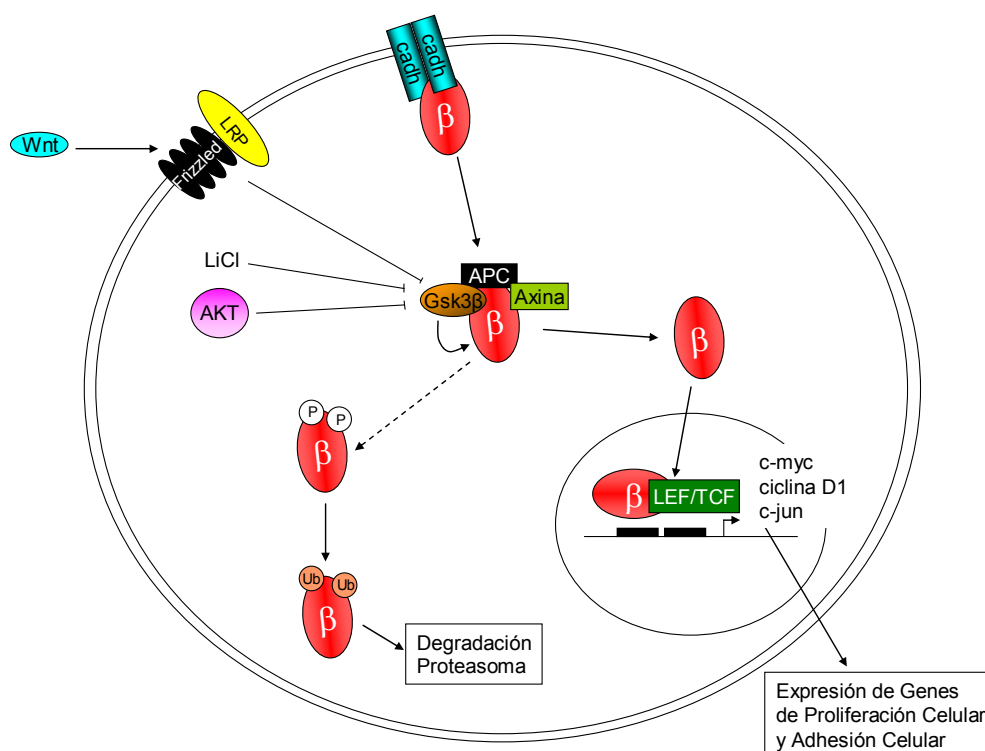


FIGURA 1: Esquema del complejo cadherina- β -catenina, sus elementos reguladores y sus posibles destinos. Cuando la β -catenina se libera de la cadherina, se asocia en el citoplasma con APC, Axina y GSK3 β ; esta última se encarga de fosforilar a la β -catenina, destinándola a degradación por el proteasoma. Cuando se inactiva la GSK3 β (por señalización de Wnt, por factores de crecimiento que activan Akt o por distintos inhibidores, como el LiCl), la β -catenina no se degrada y puede entrar en el núcleo, donde actúa se asocia con LEF/TCF y actúa como factor de transcripción para la expresión de genes de proliferación y adhesión celular.

Otros estímulos que permiten la acumulación de β -catenina citoplásmica y el aumento de su actividad como factor de transcripción son los factores de crecimiento.

Se ha descrito que uno de los efectos de las cascadas de señalización es la inactivación de GSK3 β , generalmente por fosforilación por Akt (62). Otro agente que lleva a la inactivación de GSK3 β y, por tanto, la acumulación de β -catenina citoplásmica es el litio, ya que es capaz de actuar como inhibidor específico y no competitivo de la actividad de GSK3 β (76).

La señalización inapropiada de β -catenina se ha implicado con diversos tipos de tumores; esta señalización se debe generalmente a mutaciones en los aminoácidos susceptibles de fosforilación que marcan a la β -catenina para degradación, por lo que se estabiliza, es capaz de entrar en el núcleo y promover la expresión de genes. Igualmente, no solo mutaciones en el gen de β -catenina sino en otros genes del complejo de regulación de β -catenina parecen estar relacionadas. Un caso muy claro es la implicación de APC, ya que se han descrito mutaciones inactivadoras en el 80% de casos de cáncer colorrectal (120).

Puesto que la supervivencia en suspensión es un elemento clave en la diseminación de tumores, se ha relacionado la β -catenina con la supervivencia frente a anoikis; estudios recientes han demostrado que la estabilización de β -catenina *in vitro* obtenida mediante inactivación de GSK3 β o mediante expresión regulable, aumenta la viabilidad de células mantenidas en suspensión (62;120). Si bien este fenómeno se ha descrito en células tumorales, es de gran interés conocer la implicación de la β -catenina no sólo en la anoikis endotelial, sino en otros procesos potencialmente dañinos para el endotelio.

1.4. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

El endotelio es diana de muchas moléculas que actúan como reguladores positivos de la angiogénesis. La principal molécula reguladora de la angiogénesis, tanto en procesos fisiológicos como patológicos, es el factor de crecimiento del endotelio vascular (vascular endothelial growth factor, VEGF).

El término VEGF engloba a una familia de glicoproteínas homodiméricas constituida por cinco miembros: VEGF A, B, C, D y factor de crecimiento placentario

(placental growth factor, PlGF), que pueden unirse a tres diferentes receptores de membrana: VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3 (114).

1.4.1. Familia de VEGF

El VEGF-A existe como 4 isoformas principales de 121, 165, 189 y 206 aminoácidos, producidas por “splicing” alternativo del ARN obtenido del gen del VEGF. (23) (Figura 2). Existen otras isoformas de VEGF menos comunes (145 y 183) cuya expresión se localiza en tejidos muy concretos.

PlGF se une solamente con VEGFR1 e induce un patrón de expresión de genes diferente al que induce VEGF-A al unirse a VEGFR1 (7). En ocasiones, pueden formarse heterodímeros PlGF/VEGF, que pueden unirse a VEGFR2 e incluso a heterodímeros VEGFR1/VEGFR2. La expresión de PlGF está localizada predominantemente en placenta, corazón y pulmón.

VEGF-D se expresa como pre-proteína y necesita de un procesamiento en ambos extremos para ser activa. En su forma madura, puede unirse a VEGFR2 y VEGFR3. Se ha visto que induce linfangiogénesis y angiogénesis en distintos modelos *in vivo* (16) y en ciertos tumores (2). Su expresión tiene lugar en todos los tejidos humanos pero más abundantemente en pulmón y piel durante la embriogénesis.

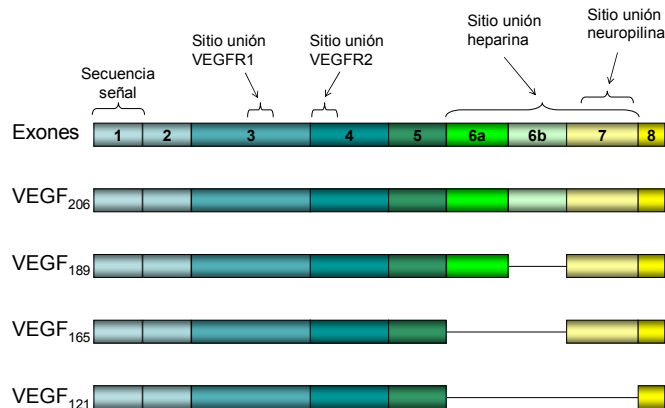


FIGURA 2: Estructura del gen del VEGF humano, indicando los diferentes sitios de unión y la composición de exones de cada isoforma de VEGF. La presencia del sitio de unión a heparina determina la solubilidad de las isoformas, siendo VEGF₂₀₆ la más afín por la matriz y VEGF₁₂₁ la más soluble. El VEGF₁₆₅ es la más abundante y presenta características de solubilidad intermedias.

Estos miembros de la familia de VEGF tienen gran interés para los abordajes experimentales, por su capacidad para unirse en exclusiva a uno u otro receptor de VEGF, permitiendo discernir la implicación de cada receptor en los propiedades biológicas de VEGF.

1.4.2. Receptores de VEGF

Los miembros de la familia de VEGF se unen a receptores de tipo tirosina quinasa. Se han identificado tres receptores de VEGF: VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR/Flk-1) y VEGFR3 (Flt4). Todos ellos comparten una estructura altamente conservada, con siete dominios semejantes a inmunoglobulinas en la región extracelular, un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico con la región tirosina quinasa interrumpida por una región no catalítica. La expresión de estos receptores se restringe a las CE (vasculares y linfáticas) salvo en algunos casos particulares (23). Una importante diferencia entre los distintos receptores es la especificidad por el sustrato, ya que cada tipo puede unir sólo algunos miembros de la familia de VEGF (Figura 3) (35).

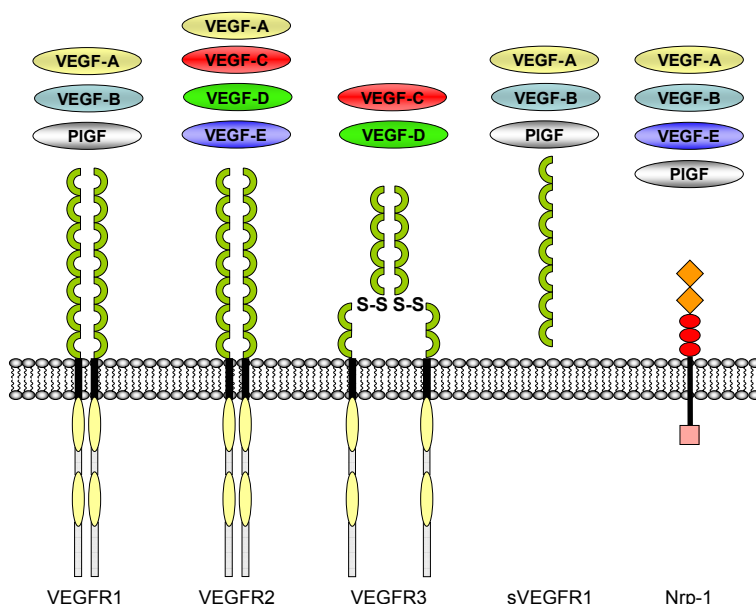


FIGURA 3: Receptores de VEGF y su afinidad por los distintos miembros de la familia de VEGF. La forma soluble del VEGFR1 (sVEGFR1) actúa como correceptor retirando el exceso de VEGF y PlGF. El receptor celular denominado neuropilina 1 (Nrp-1) ancla VEGF a la membrana y aumenta, de este modo, la cantidad de VEGF-A₁₆₅ que se presenta al VEGFR2. De este modo incrementa la efectividad de VEGFR2.

1.4.3. Regulación de la expresión génica de VEGF

El principal factor en la regulación de la expresión génica de VEGF es la tensión de oxígeno, ya que una baja tensión provoca un aumento de la expresión del ARNm de

VEGF. El factor inducible por hipoxia (HIF-1) es el sensor de esta tensión de oxígeno. En condiciones de normoxia, la subunidad α de HIF-1 se sintetiza continuamente, pero al mismo tiempo se está degradando por el proteasoma, impidiendo que HIF-1 actúe; en condiciones de hipoxia, la subunidad α se mantiene estable (no se marca para degradación), puede entrar en el núcleo y unirse al promotor de VEGF, que presenta secuencias de reconocimiento conocidas como hypoxia-responsive elements (HRE), presentes también en otros genes que responden a hipoxia (95).

Algunos factores de crecimiento (EGF, TGF- α , TGF- β , keratinocyte growth factor, insulin-like growth factor, FGF, PDGF) también aumentan la cantidad del ARNm de VEGF (34). Algunas transformaciones celulares, como mutaciones en oncogenes (96) o en genes supresores de tumores (107) incrementan la expresión de VEGF; este último aspecto facilitaría la progresión del tumor por la inducción de angiogénesis para nutrir al tejido neoplásico.

1.4.4. Señalización por VEGF y sus efectos sobre el endotelio

Cuando se habla de señalización por VEGF en CE, casi todos los estudios se han centrado en la originada desde VEGFR2; en parte se debe a que, si bien la afinidad por el sustrato de VEGFR1 es mayor ($K_d = 10$ pM), la autofosforilación y el incremento de la actividad quinasa no es muy elevado y la señalización intracelular es más débil. No se considera al VEGFR3 puesto que su expresión se restringe al endotelio linfático.

La señalización por VEGFR2 comienza cuando se une VEGF, lo que tiene como resultado la dimerización y fosforilación de diversas tirosinas en el dominio quinasa del receptor, poniéndose en marcha distintas cascadas de señalización (TABLA 1)

TABLA 1

	Acciones	Mecanismos
VEGFR1	<ul style="list-style-type: none"> • Reorganización actina 	<ul style="list-style-type: none"> • Activación p38-MAPK
VEGFR2	<ul style="list-style-type: none"> • Proliferación • Supervivencia/Protección • Permeabilidad • Migración celular 	<ul style="list-style-type: none"> • Activación ERK • Activación PI3K/Akt, inhibición Bad y Caspasa 9 • Activación PI3K/Akt – eNOS • Activación p42/p44-MAPK

TABLA 1: Acciones propuestas desencadenadas por señalización a través de los receptores de VEGF y los mecanismos involucrados en cada acción.

Las propiedades protectoras de VEGF han sido estudiadas extensamente. Se conoce la capacidad de VEGF de inducir la expresión de proteínas antiapoptóticas, tales como Bcl-2 y A-1, que actúan tanto reduciendo la actividad de caspasas como induciendo inhibidores de apoptosis (IAP) como la survivina (87;118). Además, se conoce la capacidad de VEGF de activar una ruta principal de supervivencia celular: PI3K/Akt. La actividad quinasa de Akt fosforila a distintas proteínas, algunas para su inactivación (Bad y caspasa 9) y cuyo resultado es la inhibición de la apoptosis. Akt es responsable, mediante la fosforilación de NO sintasa endotelial (eNOS), de incrementar la producción de óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI₂), mediadores también de la supervivencia endotelial (122).

Cabe destacar que la capacidad de señalización de VEGFR2 está muy influida por el estado de adhesión de las CE. Se ha visto que la VE-cadherina forma un complejo con VEGFR2 necesario para que el receptor pueda señalizar (17). Igualmente, se ha descrito que VEGFR2 es incapaz de fosforilarse si no hay una correcta adhesión a través de la integrina $\alpha_v\beta_3$; en este caso, el receptor se encuentra desacoplado y requiere de la subunidad β_3 para la dimerización y fosforilación del dominio quinasa (110). En relación al tema de esta tesis, si bien como acabamos de señalar, la señal de VEGF se halla bloqueada en CE en suspensión, no se conocen los efectos del preconditionamiento con VEGF previo a la pérdida de adhesión.

Muchas otras rutas se ponen en marcha por la acción de VEGF, si bien los efectos del VEGF sobre el endotelio (proliferación, supervivencia, migración y permeabilidad) se pueden explicar por los mecanismos anteriores (23).

1.5. La ruta JAK/STAT

Una de las rutas recientemente identificada como activada por VEGF es la Janus Kinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription (JAK/STAT). Con anterioridad, ya se había descrito la activación de esta ruta por PDGF y por EGF (9), y recientemente se han identificado varios ligandos más con capacidad activadora de la vía. Ésta, prácticamente desconocida hasta hace poco tiempo, está demostrando una importancia insospechada como medio de señalización. La disponibilidad de abordajes

farmacológicos de estimulación e inhibición incrementa aún más su interés y las potencialidades prácticas de intervenciones sobre esta vía.

1.5.1. Señalización y efectos

La ruta en sí es bastante sencilla: la unión del ligando (ya sea citoquina o factor de crecimiento) al receptor produce un cambio conformacional en el dominio citoplásmico, provocando la activación de unas quinasas de la familia JAK asociadas al receptor. Estas JAKs son capaces de fosforilar residuos de tirosina específicos del receptor, que actúan como puntos de anclaje de las STATs. Posteriormente, las STATs son fosforiladas por las JAKs en un residuo de tirosina, se sueltan del receptor, dimerizan y se translocan al núcleo. Allí actúan como factores de transcripción, uniéndose a secuencias específicas de promotores de genes conocidas como GAS (gamma interferon activated site) (63) (Figura 4).

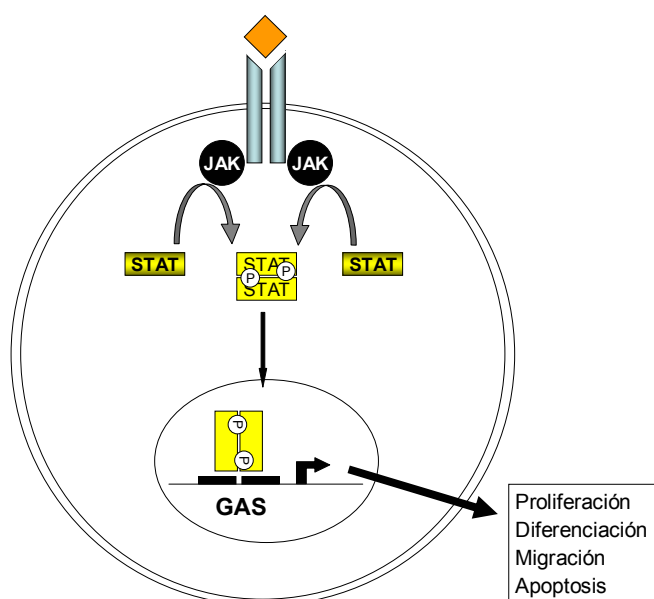


FIGURA 4: Esquema de la ruta JAK/STAT. Las JAKs se encuentran asociadas a los receptores y se fosforilan cuando se une el ligando (citoquina, factor de crecimiento). Las JAKs fosforiladas son capaces de fosforilar a las STATs, que forman un dímero y entran en el núcleo, donde se unen a secuencias específicas de promotores de genes conocidas como GAS, promoviendo su expresión.

Hasta el momento, en mamíferos se han descrito 4 JAKs diferentes: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2; la familia de STAT esta formada por 7 miembros: STAT 1, 2, 3, 4, 5A, 5B y 6 (1). Las diversas combinaciones de JAK y STAT, así como la posibilidad de las STATs de formar heterodímeros facilitan la participación de esta ruta en multitud de eventos celulares: proliferación, diferenciación, migración y apoptosis (97).

Si bien la importancia de esta ruta se ha resaltado en células del sistema inmune, recientemente se ha visto su influencia en formas de estrés celular tan diversas como la exposición a endotoxinas, luz ultravioleta o hiperosmolaridad (31). Sin embargo, en el caso del endotelio, se desconoce la implicación de esta ruta en otras formas de estrés celular, tales como la pérdida de uniones, la privación de suero o el estrés oxidativo.

En los últimos cinco años, se ha descrito que la ruta JAK/STAT se activa en diversos tipos celulares tratados con donadores o generadores de ROS. Así, Sandberg y Sayeski (105) han comunicado que la activación de JAK2 por H₂O₂ está involucrada en la apoptosis de células de músculo liso vascular; más recientemente, se ha realizado una observación similar en astrocitos (45). Además, las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxidized low density lipoproteins, oxLDL) son capaces de inducir la activación de miembros de la familia JAK (78). En conjunto, estos hallazgos indican que esta familia de quinasas se activa por estrés oxidativo. Entre los tipos celulares en que se ha identificado la activación de JAK2 durante oxidación no se ha estudiado el endotelio vascular. La CE es una de las dianas de las ROS producidas en procesos de isquemia/reperfusión y por leucocitos activados (92), por lo que se convierte en un objetivo principal de estudio, con numerosas posibilidades de aplicación.

1.5.2. Inhibición de JAK/STAT

En el estudio de JAK/STAT, una de las herramientas empleadas ha sido la inhibición farmacológica de los distintos elementos de la ruta. En la actualidad, los estudios sobre la inhibición de JAK/STAT son escasos y, en ocasiones, contradictorios. La mayoría de la información proviene del campo de la medicina cardiovascular, donde esta vía tiene un papel importante en el desarrollo de un fenotipo cardioprotector (52). Así, por ejemplo, en distintos modelos de infarto de miocardio, en unos casos la activación de JAK/STAT inhibe la apoptosis de los cardiomiocitos (78); por el contrario, en otro modelo, es la inhibición de esta ruta con AG490 la que reduce la cantidad de miocitos apoptóticos (77). La ruta JAK/STAT se halla también implicada en el efecto antiapoptótico de G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) en miocardio isquémico (51). Esos datos indican que la inhibición de JAK/STAT, activada por estrés

celular, puede tener un papel positivo o negativo en la supervivencia celular dependiendo de circunstancias no suficientemente caracterizadas. Por su gran importancia potencial, este punto preciso, el esclarecimiento del papel de esta ruta y, más concretamente, de su inhibición en la supervivencia de las CE, ha sido un objetivo central de esta tesis.

Para la inhibición de JAK2, uno de los miembros de esta familia, se empleó AG490. Se trata de un miembro de familia de las tirfostinas utilizado por primera vez como inhibidor de la actividad quinasa de JAK2 en 1996 por Meydan y cols (80). En la actualidad es el inhibidor más empleado para bloquear la ruta JAK2/STAT. Si bien se conoce su actividad como inhibidor de JAK2, se sabe relativamente poco sobre otros efectos que puede tener sobre la célula. Se ha descrito la capacidad de AG490 de inhibir la autofosforilación del receptor de EGF e incluso la actividad quinasa de JAK3; sin embargo, no se ha detectado expresión de JAK3 en el endotelio, estando aparentemente más restringida a otros tipos celulares, como linfocitos (20).

El uso de inhibidores es siempre susceptible de críticas desde el punto de vista de la especificidad. En este sentido, la transfección de formas dominantes negativas de JAK2 es una herramienta complementaria que permite la inhibición prácticamente total de JAK2, pudiéndose así asegurar su participación en un determinado mecanismo.

La identificación del papel de las vías enumeradas en la supervivencia endotelial es un objetivo prioritario en biología vascular, y con un amplio campo de aplicaciones en fisiopatología y terapéutica humanas.

OBJETIVOS

Objetivos generales

1. Estudio de la respuesta de muerte celular endotelial ante el desarraigo.

La información disponible acerca de las transformaciones y destino final de las CE desprendidas de la monocapa es extremadamente escasa. El obtener datos acerca de este aspecto de la biología endotelial tiene importancia crítica en, al menos, dos temas: comprender el significado de las CE circulantes en los mecanismos de reparación/regeneración endotelial y aportar bases de interpretación a los mecanismos de metástasis tumoral.

2. Estudio del papel de la vía JAK/STAT en la célula endotelial.

En distintos tipos celulares, la ruta de señalización JAK/STAT ha adquirido gran relevancia al asociarse su activación o inhibición a diferentes formas de estrés celular. Sin embargo, en el endotelio vascular, esta ruta no está caracterizada. Resulta prioritario conocer su implicación en algunas situaciones de estrés en que el endotelio puede encontrarse *in vivo*, el desarraigo o el estrés oxidativo.

Objetivos específicos

1. Analizar la muerte de CE por desarraigo, caracterizando los posibles mecanismos implicados, con especial referencia a la forma apoptótica de esta muerte, la anoikis.
2. Analizar el papel de la ruta JAK2/STAT y de su inhibición en la muerte de CE por desarraigo.
3. Determinar el papel de la β -catenina como molécula de doble función, estructural y de señalización transcripcional.
4. Analizar el papel de la ruta JAK2/STAT y de su activación/inhibición en el daño celular por estrés oxidativo.
5. Analizar la implicación de la ruta JAK2/STAT en modelos *in vivo* de daño endotelial.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivos Celulares

3.1.1. Obtención y cultivo primario de células endoteliales (CE)

Todas las CE utilizadas en esta tesis han sido empleadas en cultivo primario. Las CE se aislaron de aorta bovina según modificaciones del método de Jaffe y cols (5;18;82). Se recogieron las aortas bovinas en Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS) suplementado con penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), fungizona (0,67 µg/l) y vancomicina (6,4 µg/ml). Tras limpiar el tejido conectivo y ligar los vasos secundarios para evitar la salida del líquido, se llenaron las aortas con DPBS + colagenasa tipo II (0,5 mg/ml). Se incubaron a 37°C durante 20 min, tras los cuales se paró la reacción con RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Se recogió el líquido que contiene las CE, se centrifugó a 1800 rpm durante 10 min y se recogió el precipitado en el mismo RPMI-1640 usado anteriormente. Este volumen se sembró en frascos de cultivo y se cultivó a 37°C y 5% de CO₂ en un incubador humidificado. Una vez que las CE llegaron a confluencia, se levantaron con tripsina (0,25 %)/EDTA (0,01 M) y se sembraron en placas. Después de este primer pase, se utilizó un medio selectivo para CE: medio esencial mínimo con D-Valina (MEM D-Val), suplementado con 20% de SFB, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y aminoácidos no esenciales (1x). Las células se usaron entre los pases 2 y 5 para los diferentes experimentos. Las células se caracterizaron como endoteliales por su fenotipo característico y apariencia en "pavimento", crecimiento en monocapa y tinción con anti-Factor VIII. Con anterioridad, el Laboratorio había realizado una caracterización exhaustiva de estas células, incluyendo tinciones para filamentos intermedios (desmina, vimentina), F-actina y microscopía electrónica.

3.1.2. Cultivo de MG63 y preparación de medio condicionado (MC)

Estas células osteoblásticas tumorales se seleccionaron, en primer lugar, por su capacidad de producir VEGF basalmente en cantidades importantes, que se incrementa en condiciones de hipoxia (3). Por otra parte, las MG63 son células tumorales que crecen adecuadamente en el mismo medio que las CE, lo que constituye un factor

esencial para preparar el MC, puesto que las CE son extremadamente sensibles a los cambios de medio.

Las MG63 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATTC CRL 1427) y se crecieron en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) suplementado con 10% de SFB, glucosa (1 g/L), L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml).

Los experimentos se realizaron con células confluentes en medio libre de suero. Para preparar el MC, una vez llegadas las células a confluencia, se reemplazó el medio DMEM por MEM D-Val sin suero. Después de 24h de incubación, el medio se recolectó y se filtró para eliminar posibles restos de células tumorales. Este medio se añadió a las CE sin realizar modificaciones.

3.1.3. Transfección de CE

Se empleó como agente transfectante Lipofectina. Las CE se sembraron a una concentración de 20000 cels/cm² sobre placas P50 o sobre pocillos de P6 o P12 según el diseño experimental. Al día siguiente, se realizó la transfección. Para ello, a dos tubos con medio MEM D-Val (sin ningún suplemento) se añadió Lipofectina (15 µl por cada ml de medio) o ADN (3 µg/ml) respectivamente. Se dejaron a t^a ambiente durante 45 min y, posteriormente, se mezclaron y se incubaron 30 min más. Las CE se lavaron con medio MEM D-Val (sin suplementos) y se les añadió la mezcla MEM D-Val –ADN– lipofectina. Este medio se dejó durante 24 h, transcurrido el cual se cambió por medio de crecimiento MEM D-Val con 20% de SFB, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) y aminoácidos no esenciales (1x).

Se emplearon plásmidos que expresaban una forma “wild-type” de JAK2 o una forma dominante deficiente en el dominio quinasa de JAK2 (Cedidos por el Dr. Dwayne L Barber, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadá) para abordar el bloqueo de JAK2 por un método diferente al inhibidor AG490. Para la sobreexpresión de β-catenina, se empleó un plásmido que portaba la secuencia completa de β-catenina (Cedido por la Dra. Amparo Cano, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Autónoma de Madrid). Paralelamente, en todas los casos se transfectó con el vector vacío para determinar el posible efecto de toda la maniobra de transfección.

Para evaluar la eficacia de la transfección, se empleó el plásmido pEGFP-N1 vector (BD Biosciences). En todos los casos, la eficacia de transfección fue superior al 50%.

3.2. Maniobras de daño endotelial

Las CE en cultivo son muy sensibles a diferentes tipos de daño celular, desde la rotura de las uniones hasta el estrés oxidativo, incluyendo el cultivo en ausencia de suero. Con el fin de conocer mejor los mecanismos implicados en estos procesos, las CE se sometieron a diversos estímulos.

De modo general, y si no se indica lo contrario, las CE en confluencia se depletaron con MEM D-Val con 1% SFB durante 24 h con objeto de sincronizar las CE, al detenerse la división celular por inhibición por contacto, y de llevarlas a un estado basal semejante al que se encuentran en los vasos sanguíneos. Para conocer la implicación de las diversas rutas de señalización, se emplearon inhibidores farmacológicos específicos, a concentraciones previamente caracterizadas en nuestro Laboratorio. El tratamiento con estos inhibidores fue siempre similar, poniendo el inhibidor 45 min antes de realizar el estímulo de daño sobre las CE. Las maniobras de agresión endotelial fueron las siguientes:

3.2.1. Cultivo en ausencia de suero

Tras 24 h de depleción, las CE se cultivaron en MEM D-Val sin suplemento de SFB, durante un periodo de tiempo variable, según el mecanismo a examinar.

3.2.2. Estrés oxidativo

Tras 24 h de depleción, las CE se cultivaron en MEM D-Val sin SFB en presencia de H₂O₂ (de 100 µM a 1 mM) o Xantina Oxidasa (XO, 5 mU) + Hipoxantina (HX, 2 mM) (44;58) como agentes productores de ROS. En otra serie de experimentos se emplearon drogas o medios que ejercen daño endotelial por la generación de ROS de manera indirecta.

Para asemejar las condiciones en las que se conservan los órganos para trasplantes, utilizamos medio de conservación de órganos EuroCollins; la exposición de estas células a esta solución provoca un daño oxidativo (93).

En otra serie de experimentos vinculados a la agresión endotelial en el trasplante, empleamos ciclosporina (CsA, 10 μ M), que además de bloquear a la ciclofilina, induce la producción de ROS (73).

Las concentraciones empleadas fueron determinadas mediante experiencias previas de nuestro Laboratorio. La duración del experimento fue variable dependiendo del mecanismo a determinar.

3.2.3. Cultivo en suspensión

Una vez superado el periodo de depleción, las CE se sometieron a los distintos pretratamientos durante otras 24 h. Posteriormente, las CE se cultivaron en suspensión; para ello, se despegaron con tripsina (0,25 %)/EDTA (0,01 M) y se resuspendieron en MEM D-Val al 1% SFB, con el fin de evitar muerte debida a la ausencia completa de SFB, vg, factores de crecimiento. Estos experimentos se llevaron a cabo con dos métodos diferentes.

1. Las CE resuspendidas se transfirieron a un frasco agitador de 100 ml con agitador (Integra Biosciences) con las paredes pretratadas con Sigmacote para evitar la adhesión celular a las paredes. Para la preparación de los frascos agitadores, por las paredes de cada frasco agitador se dejó caer 10 ml de Sigmacote hasta cubrir toda la pared, se recogió el exceso y se dejó secar lo que quedó adherido a las paredes. A distintos tiempos, se recogieron 2 ml del volumen de suspensión y se procesó para citometría de flujo.
2. Las CE resuspendidas se repartieron en pocillos de P6 o en placas P50 tratados con Poly-2-hidroxietilmetacrilato (Poly-HEMA), que impide la adhesión celular. Para la preparación de los pocillos, se dejaron secar con 0.1 ml/cm² de Poly-HEMA (12 mg/ml) diluido en etanol 95% estéril, en un ambiente estéril. Este proceso se repitió dos veces. Antes de su uso, los pocillos se lavaron dos veces con PBS células estéril. A los tiempos indicados, se recogió el volumen de cada pocillo (2 ml) y se procesó para citometría de flujo.

Ambos métodos proporcionaron resultados similares; por esta razón, se empleó principalmente el método del Poly-HEMA para los experimentos por su menor gasto y mayor sencillez y la posibilidad de preparar más réplicas.

3.3. Citometría de flujo

Se realizó por el método de Nicoletti y cols modificado (85). Las CE se recogieron, según el diseño experimental, en confluencia o en suspensión. Una vez recolectadas, las CE se centrifugaron a 900 rpm durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en suero fisiológico que contenía Ioduro de Propidio (IP, 0,1 mg/ml) (Sigma), Igepal 0,05% y RNasa (20 µg/ml). Se dejó durante 1 h en oscuridad a 4°C. La fluorescencia del IP se analizó en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) mediante el programa CELLQuest (BD Biosciences). Se registró el porcentaje de células por debajo del pico G0/G1 como células muertas.

3.4. Ensayo de resiembra sobre Matrigel

Las CE se cultivaron en suspensión como se indica en el apartado 3.2.3. A diferentes tiempos (0 a 48 h), las CE se recogieron y se sembraron en pocillos de P12 tratados con Growth Factor-Reduced Matrigel. El Matrigel es un preparado de membrana basal solubilizado extraído de un tumor muy rico en proteínas de matriz extracelular. Una vez reconstruido sobre los pocillos, actúa como una matriz extracelular *in vivo* sobre la que las CE pueden crecer, haciendo del Matrigel un sustrato adecuado para los estudios de resiembra, así como de proliferación o migración. Las CE se crecieron sobre el Matrigel en el medio de la suspensión (MEM D-Val al 1% SFB) durante 24 h, tras las cuales se fijaron con Merckofix y se tiñeron con cristal violeta (1% en solución salina). Las CE se fotografiaron con una cámara digital Nikon Coolpix 995, acoplada a un microscopio invertido Leica. Las diferencias se determinaron contando el número de células en 10 campos al azar por dos observadores independientes, que ignoraban el tipo de experimento.

Para preparar los pocillos con Matrigel, se diluyó 1:1 con PBS frío, se añadió 150 µl en cada pocillo y se dejó polimerizar durante 1-2 h a 37 °C.

3.5. Ensayo de actividad de la caspasa 3

La actividad de la caspasa 3 se cuantificó usando el Kit comercial específico: “Caspase 3 assay kit”, de acuerdo con las instrucciones comerciales. Este método se basa en la ruptura, por acción de la caspasa 3, del sustrato fluorogénico Ac-DEVD AMC. Las CE se crecieron hasta confluencia en pocillos de P12, se depletaron con MEM D-Val al 1% SFB durante 24 h y se expusieron, durante otras 24 h, a distintas maniobras de daño endotelial. Tras este tratamiento, las CE se lisaron con tampón de lisis ensayo caspasa 3. Del lisado obtenido (75 μ l), una parte se empleó para medir la concentración de proteínas (25 μ l) y al resto (50 μ l) se le añadió el tampón de ensayo de caspasa 3. Se dejó en oscuridad durante 2 h a 37°C y se midió la fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}}$: 380 nm; $\lambda_{\text{emisión}}$: 440 nm). Los resultados presentados son relativos a la concentración de proteínas.

3.6. Ensayo de citotoxicidad mediante liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)

Para cuantificar el daño celular se empleó el kit comercial “Cytotox 96® non-radioactive cytotoxicity assay”. Las CE, crecidas hasta confluencia en pocillos de P96, se depletaron con MEM D-Val al 1% SFB durante 24 h y se sometieron a diversos estímulos potencialmente productores de daño endotelial, en un volumen total de 150 μ l. A las 24 y 48 h de poner a las CE en condiciones deletéreas, se recogieron 50 μ l de medio para determinar la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio, mediante una reacción enzimática colorigénica (medida de absorbancia a 490 nm). Posteriormente se lisaron las CE con Triton X-100 y se determinó la cantidad total de LDH que contenían las CE. La medida relativa de liberación de LDH a las 24 y a las 48 h se obtuvo como el cociente entre la LDH medida a las 24 o a las 48 h y la LDH total.

3.7. Análisis de proteínas

3.7.1. Extracción de proteínas

Se usaron distintos tampones de extracción, con objeto de realizar una separación diferencial de fracciones celulares u obtener extractos totales que incluían

las proteínas ancladas a la membrana celular. El empleo de cada tampón dependió de la/s proteína/s que se quisieron determinar tras cada experimento.

En todos los casos, las CE se recogieron mediante raspado (en el caso de CE confluentes en monocapa) o mediante centrifugación (en el caso de CE en suspensión), se lavaron con PBS células y se les añadió el tampón de extracción (TABLA 2).

TABLA 2

Tampón	Composición	Referencias
T. RIPA (proteínas totales)	50 mM Tris HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Igepal, 0.5% Deoxycholate, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, 1 mM Na ₃ VO ₄ , 10 µg/ml Leupeptina, 5 µg/ml Aprotinina, 1 mM PMSF	(89)
T. extracción citosólicas y nucleares	Prots citosólicas: 10 mM Hepes pH 7,6, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,5 % Igepal, 0,5 mM PMSF, 3 mM DTT, 2,5 µg/ml Aprotinina, 2,5 µg/ml Pepstatina A, 2,5 µg/ml Leupeptina. Prots nucleares: 20 mM Hepes pH 7,6, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5 mM PMSF, 3 mM DTT, 2,5 µg/ml Aprotinina, 2,5 µg/ml Pepstatina A, 2,5 µg/ml Leupeptina.	(106)
T. extracción proteínas fosforiladas	50 mM Tris HCl pH 6,8, 5 mM MgCl ₂ , 0,5% Igepal, 1µg/ml Pepstatina, 1µg/ml Aprotinina, 1µg/ml Leupeptina, 20 mM NaF, 1 mM PMSF, 3 µM DTT	(19)

TABLA 2: Tampones empleados para la extracción diferencial de proteínas

3.7.2. Western Blot

Las muestras de lisados celulares se calentaron a 95 °C durante 10 min y se separaron en gel de SDS–poliacrilamida (bajo condiciones reductoras – 10% 2–mercaptoetanol) y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon durante 1 h con PBT o TBT + 5% leche descremada en polvo y se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario. Tras tres lavados de 5 min con TBT o PBT según corresponda, las membranas se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario durante 1 h, a t^a ambiente. Tras cuatro lavados de 15 min, las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia (ECL).

Para normalizar la cantidad de proteínas cargadas en los geles, las membranas se lavaron y rehibridaron para determinar la α -tubulina. La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó empleando el software ImageJ (NIH, Bethesda).

Las condiciones de los Western blots, así como los anticuerpos empleados, se describen en la tabla 3.

TABLA 3

Ac 1 ^{ario}	Incubación 1 ^{ario}	Ac 2 ^{ario}	Incubación 2 ^{ario}	Kda	Casa Comerciales
Akt	1/1000 en TBT + 5% BSA	Ac-conejo	1/2000 en TBT + 5% leche	60	Cell Signaling
Bax	1/2000 en PBT + 5% leche	Ac-conejo	1/4000 en PBT + 5% leche	23	Santa Cruz Biotechnology Inc.
Bcl-2	1/500 en TBT + 5% BSA	Ac-ratón	1/6000 en TBT + 5% leche	26	BD Biosciences
Fosfo-Akt	1/1000 en TBT + 5% BSA	Ac-conejo	1/2000 en TBT + 5% leche	60	Cell Signaling
Fosfo-GSK3 α/β	1/1000 en TBT + 5% BSA	Ac-conejo	1/2000 en TBT + 5% leche	51, 46	Cell Signaling
Fosfo-JAK2	1/1000 en TBT + 5% BSA	Ac-conejo	1/6000 en TBT + 5% leche	130	Biosource
Fosfo-p44/p42-MAPK	1/1000 en TBT + 5% BSA	Ac-conejo	1/2000 en TBT + 5% leche	44/42	Cell Signaling
GSK3 β	1/1000 en TBT + 5% BSA	Ac-conejo	1/2000 en TBT + 5% leche	46	Cell Signaling
JAK2	1/1000 en TBT + 5% BSA	Ac-conejo	1/6000 en TBT + 5% leche	130	Cell Signaling
p44/p42-MAPK	1/1000 en TBT + 5% BSA	Ac-conejo	1/2000 en TBT + 5% leche	44/42	Cell Signaling
α -tubulina	1/2000 en PBT + 5% leche	Ac-ratón	1/6000 en PBT + 5% leche	50	Sigma-Aldrich
β -catenina	1/1000 en TBT + 5% leche	Ac-conejo	1/6000 en TBT + 5% leche	92	BD Biosciences
β -catenina activa (no fosforilada en Ser ⁴⁷ y Thr ⁴¹)	1/1000 en TBT + 5% leche	Ac-ratón	1/2000 en TBT + 5% leche	92	Upstate

TABLA 3: Anticuerpos empleados, incluyendo sus condiciones de empleo, el peso molecular de la proteína que reconocen y la casa comercial que lo distribuye

3.7.3. Ensayo de retardo en movilidad electroforética

El ensayo de retardo en movilidad electroforética (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA) se desarrolló empleando proteínas nucleares (8 μ g) y diferentes oligonucleótidos consenso (ADNs, 0,5 ng) marcados con [γ -³²P] dATP en tampón de unión de EMSA 1x, al que se incluyó Poly (dI-dC) como ADN competitivo. Tras la incubación, las muestras se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida-

bisacrilamida al 6% en TBE 0,25x. Los geles se secaron y se expusieron a películas X-Omat durante 24 h a -80°C .

Los oligonucleótidos comerciales (Santa Cruz Biotechnology Inc.) empleados fueron:

Oligonucleótidos Stat3: 5' – GAT CCT TCT GGG AAT TCC TAG ATC – 3'

3' – CTA GGA AGA CCC TTA AGG ATC TAG – 5'.

3.8. Ensayo de actividad de β -catenina/TCF (TOP/FOP)

Para estos ensayos de actividad de β -catenina/TCF, las CE crecidas en pocillos de P24 hasta un 60–80 % de confluencia se transfectaron mediante Lipofectina con 20 ng de pTK-Renilla (Promega) y 200 ng de pTOPFLASH (Top) o pFOPFLASH (Fop) (Cedidos por la Dra. Amparo Cano, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC, Universidad Autónoma de Madrid). Estos plásmidos contienen, respectivamente, sitios multiméricos de unión LEF/TCF “wild-type” (TOP) o mutantes (FOP) fusionados con un gen reportero de luciferasa (33). Tras 6 h de transfección en ausencia de SFB, las células se crecieron en MEM D-Val+20% SFB. Las CE fueron, posteriormente, sometidas a las condiciones experimentales durante 24 h, tras las cuales se midió la actividad luciferasa y Renilla mediante el uso del kit comercial “Dual Luciferase Reporter Kit”.

En algunas ocasiones, se transfectó a la vez con 400 ng de un plásmido activador que codifica para una forma metabólicamente estabilizada de β -catenina (S33Y). En estos casos, la cantidad de ADN fue normalizada con el vector vacío pCI-neovector.

3.9. Ensayo de fragmentación del ADN

Las CE se recogieron de cultivos en suspensión para inducir anoikis. Tras lavar dos veces con PBS, se lisaron con 20 μl de tampón de lisis de escalera de ADN, dejándolo actuar durante 30 min en hielo. Se centrifugó a 12000 rpm durante 30 min y se recogió el sobrenadante, al que se añadieron 5 μl de proteinasa K (20 mg/ml) manteniendo las muestras durante una hora a 50°C . Posteriormente, se añadió RNasa (10 mg/ml), realizando otra incubación de una hora a 50°C y, finalmente, 10 min a

70°C. Se añadieron 10 µl del tampón de carga escalera de ADN y se cargó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,5% en TAE 1X. Tras correr las muestras, se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron y fotografiaron las muestras bajo luz ultravioleta.

3.10. Microscopía confocal

3.10.1. Inmunofluorescencia

Las CE se crecieron hasta confluencia en portas tratados (coverslides culture chambers, BD Biosciences) donde se sometieron a los distintos tratamientos. Las CE se fijaron con Merckofix y se permeabilizaron con PBS+0,2 % Triton X-100 durante 15 min. Después de 3 lavados con PBS, las CE se incubaron durante 1 h con tampón de bloqueo (PBS+1% albúmina de suero bovino (BSA)). Posteriormente, se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario, anti-β-catenina (BD Biosciences) o anti-PECAM-1 (R&D Systems) en PBS+1% BSA. Nuevamente, se hicieron 3 lavados con PBS y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC (Sigma-Aldrich) durante 2 h a t^a ambiente. Para la visualización de los núcleos, se incubó las CE con ioduro de propidio (IP; 0,05 µg/ml) en PBS durante 45 min. Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron con un Confocal System TCS SP20 (Leica).

3.10.2. Medida del estado oxidativo mediante dihidrorodamina 123

La dihidrorodamina 123 (Molecular Probes) es una molécula permeable a la membrana celular; una vez en el citoplasma, reacciona con las ROS, oxidándose a rodamina, que es fluorescente (100;116). Por tanto, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la actividad de ROS intracelular.

Las CE se dejaron crecer hasta confluencia en pocillos de coverslides culture chambers (BD Biosciences) donde se sometieron a los distintos tratamientos (H₂O₂ 100 µM, 1h) en presencia de AG490. Durante los últimos 15 min de tratamiento, se añadió la dihidrorodamina 123 (10 µM) y se incubó durante los 15 min restantes. Las CE se lavaron dos veces con PBS células y se fijaron con Merckofix. Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron con un Confocal System TCS SP20 (Leica) ($\lambda_{\text{excitación}}$:

485 nm; $\lambda_{\text{emisión}}$: 530 nm). Para la comparación entre distintos tratamientos, todas las fotografías se realizaron empleando idénticas condiciones de exposición.

3.11. Estudios *in vivo*

Los estudios se llevaron a cabo en ratones macho adultos C57Bl/6 de 9 a 12 semanas de vida y 35–40 gr de peso (Harlan Interfauna). Todo el procedimiento se realizó de acuerdo con las pautas marcadas por la normativa internacional y con acuerdo del comité Institucional de Investigación Animal. Los ratones se dividieron en 4 grupos (n=6): Control (DMSO), AG490 (1.5 mg/kg/día, i.p.), CsA (250 mg/kg/día, s.c.) y CsA+AG490. La dosis de CsA se basó en datos previos del Laboratorio (5). El tratamiento con AG490 (o su vehículo DMSO) se realizó una hora antes de la administración de la CsA. Los ratones se mataron a los 5 días de tratamiento por sobredosis de anestésico, infundiéndolos con tampón Ringer Lactato. Para la tinción de los capilares peritubulares, se incubaron (4°C, toda la noche) las secciones desparafinadas con la lectina de *Bandeiraea simplicifolia* BS-I con peroxidasa asociada (12,5 µg/ml) (Sigma–Aldrich) en PBS+0,1 mM CaCl₂, MgCl₂, MnCl₂+0,1% Triton X–100 (109). Esta lectina se une con mayor intensidad a la superficie celular en CE dañadas (24). Los CE se detectaron mediante la actividad peroxidasa empleando HRP–3'3'diaminobenzidina–H₂O₂ (Sigma–Aldrich). Como contraste, las secciones se tiñeron con hematoxilina. Dos observadores independientes, desconocedores de la identidad de las muestras, se encargaron de la clasificación del daño de los capilares peritubulares, de acuerdo con la intensidad de la señal de la lectina, en una escala (4 grados) de intensidad de color. Las CE se fotografiaron con una cámara digital Nikon Coolpix 995 acoplada a un microscopio.

3.12. Datos estadísticos

Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media. Excepto indicación específica, cada valor corresponde a un mínimo de 3 experimentos hechos por triplicado. Las comparaciones se hicieron mediante el test de ANOVA o la prueba de t de Student, emparejada o no emparejada. Se utilizaron los test de Fisher y Scheffé

para comparaciones múltiples para determinar el nivel de significación de p , que se consideró significativo a valores $< 0,05$. Las comparaciones entre cada condición de los experimentos y con el basal se hicieron con estos cálculos. Todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 13.0 for Windows (SPSS Inc.).

3.13. Productos y casas comerciales

3.13.1. Reactivos

2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
Ac-DEVD AMC	BD Biosciences
Acrilamida/bisacrilamida 29/1 (40%)	Serva
Ac-VEGF	R&D Systems
Ac-VEGFR2/KDR (mAb 3.83)	Imclone Inc
AG490	Calbiochem
Agarosa de bajo punto de fusión	Sigma-Aldrich
Aprotinina	Sigma-Aldrich
Azul de bromofenol	Sigma-Aldrich
Azul tripan	Sigma-Aldrich
Bromuro de Etidio	Bio-Rad
BSA	Sigma-Aldrich
CaCl ₂	Sigma-Aldrich
Ciclosporina A	Sigma-Aldrich
Colagenasa tipo II	Sigma-Aldrich
Cristal violeta	Sigma-Aldrich
Deoxicholato sódico	Sigma-Aldrich
Dihidrorodamina 123	Molecular Probes
DMSO	Sigma-Aldrich
DTT	Sigma-Aldrich
EDTA	Serva
EGF	Invitrogen
EGTA	Sigma-Aldrich
Etanol 95%	Panreac
Glicerol	Sigma-Aldrich
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich
H ₃ BO ₃	Serva
HEPES	Sigma-Aldrich
Hipoxantina (HX)	Sigma-Aldrich
HRP-3'3'-diaminobenzidina	Sigma-Aldrich
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
Ioduro de propidio (IP)	Sigma-Aldrich
KCl	Panreac
KH ₂ PO ₄	Merck
Laurylsarkosina	Sigma-Aldrich

Leche desnatada en polvo	Nestle
Leupeptina	Sigma-Aldrich
LiCl	Sigma-Aldrich
Lipofectina	Invitrogen
LY294002	Sigma-Aldrich
Merckofix	Merck
MgCl ₂	Merck
MnCl ₂	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
NaF	Sigma-Aldrich
NaH ₂ PO ₄	Merck
PD98059	Calbiochem
Pepstatina	Sigma-Aldrich
PIGF	R&D Systems
PMSF	Sigma-Aldrich
Poly (dI-dC)	Amersham
Poly-2-hidroxietilmetacrilato (Poly-HEMA)	Sigma-Aldrich
Proteinasa K	Sigma-Aldrich
Reduced Matrigel Growth Factor (Matrigel)	BD Biosciences
Ribonucleasa A (RNasa)	Sigma-Aldrich
Sacarosa	Sigma-Aldrich
SB216763	Sigma-Aldrich
SDS	Serva
Sigmacote	Sigma-Aldrich
Tris	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck
VEGF	R&D Systems
VEGF-D	R&D Systems
Xantina Oxidasa (XO)	Sigma-Aldrich
ZnCl ₂	Sigma-Aldrich

3.13.2. Medios de cultivo o incubación

Aminoácidos no esenciales	Gibco
DMEM	Gibco
Estreptomicina	Laboratorios Normon
Glucosa	Sigma-Aldrich
L-glutamina	Sigma-Aldrich
MEM D-Val	Gibco
Penicilina	Laboratorios Normon
RPMI-1640	Gibco
SFB	Gibco
Tripsina-EDTA	Gibco

3.13.3. Kits comerciales

Caspase 3 assay kit	BD Biosciences
Coomasie Protein Assay Reagent Kit	Pierce
Cytotox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega
Dual Luciferase Reporter Kit	Promega
ECL	Amersham
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen

3.13.4. Isótopos

[γ - ³² P]dATP (10 mCi/ml)	Amersham
---	----------

3.13.5. Tampones y soluciones

DPBS: 2,6 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 8 mM NaH₂PO₄, 5,6 mM Glucosa, pH=7,4.

EuroCollins: 138,8 mM dextrosa, 15,1 mM KH₂PO₄, 42,5 mM K₂HPO₄, 15 mM KCl, 10 mM NaHCO₃.

PBS células: 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 0,14 mM NaCl, pH=7,6.

PBS: 100 mM Na₂HPO₄, 22,6 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl.

PBT: 100 mM Na₂HPO₄, 22,6 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 0,05% Tween 20

TBE 1x: 9 mM Tris, 9 mM H₃BO₃, 0,25 mM EDTA.

TBT: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH=7,6.

Tampón de carga escalera de ADN: 1% agarosa bajo punto de fusión, 40% sacarosa, 0,25% azul de bromofenol.

Tampón de ensayo de caspasa 3: 40mM HEPES pH 7.5, 20% Glicerol, 2,33 mM DTT, 20 μ M Ac-DEVD-AMC.

Tampón de lisis ensayo caspasa 3: 5 mM Tris-HCl pH=8, 20 mM EDTA, 0,5% Triton X-100.

Tampón de lisis escalera de ADN: 20 mM EDTA, 0,5% Sodium laurilsarkosine, 50 mM Tris-HCl pH 7,4.

Tampón de unión de EMSA 1x: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM KCl, 1 mM EDTA, 4% glicerol, 0,25 mM MgCl₂, 0,125 mM ZnCl₂, 5 mM DTT.

Tampón Ringer Lactato: 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 26 mM Lactato.

RESULTADOS

4.1. Análisis de mecanismos inducidos por el MC de MG63

El presente estudio partió de resultados previos del Laboratorio, que mostraban de forma descriptiva, que el MC de MG63 tenía potentes efectos protectores sobre las CE en monocapa. De los estudios anteriores sabíamos también que el VEGF era un componente crítico para los citados efectos citoprotectores del MC sobre el endotelio. A partir de estos datos, las principales incógnitas abarcaban a) los mecanismos específicos de esta citoprotección y b) averiguar si los efectos del MC de MG63 y del VEGF podían aplicarse a CE en condiciones distintas que la monocapa, vg, en suspensión.

Para examinar en mayor profundidad los mecanismos implicados en el efecto protector del MC de MG63 sobre las CE (19), estudiamos qué influencia podía tener sobre las rutas de supervivencia mejor conocidas.

El MC de MG63 indujo en las CE la activación de la ruta de supervivencia PI3K/Akt y de la ruta de proliferación de las MAPK, de manera tiempo-dependiente (Figura 5). Esta activación se manifiesta por el incremento de la formas fosforiladas, monitorizadas mediante Western blot con anticuerpos específicos. En consonancia con este hallazgo, esta activación resultó inhibida en presencia de inhibidores específicos de estas rutas, como LY294002 (20 μ M) y PD98059 (50 μ M) respectivamente.

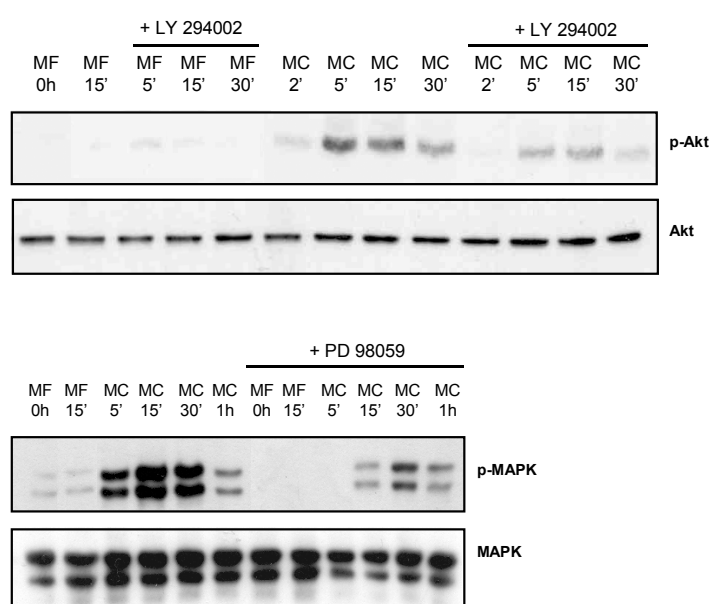


FIGURA 5: Western blot de p-Akt y p-MAPK: El MC induce la fosforilación tanto de Akt como MAPK, que no se observa con el MF. El inhibidor de PI3K LY294002 (20 μ M) y el de MAPKK PD98059 (50 μ M) se usaron para inhibir dicha fosforilación. La inhibición con LY294002 es completa y con PD98059 es prácticamente completa. Akt y MAPK total se usaron como control de carga.

Asimismo, la exposición de las CE al MC indujo una disminución en la actividad de la caspasa 3 (caspasa ejecutora de apoptosis) a partir de las 6 h de exposición, frente a su control sin suero. Esta disminución fue significativa transcurridas 24h desde la incorporación del medio tumoral (Figura 6). En cualquier caso, la actividad disminuyó significativamente en todos los periodos cuando las células se mantuvieron en su medio de crecimiento con 20% de SFB.

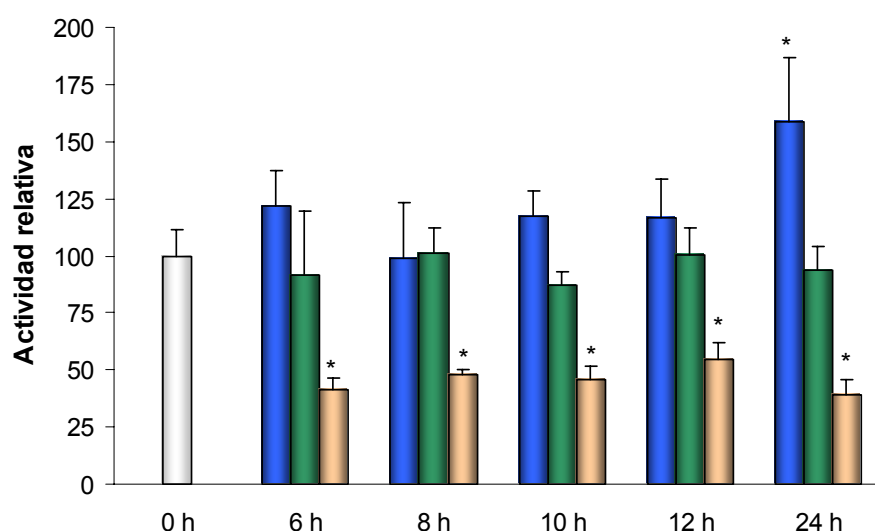


FIGURA 6: Medida de la actividad relativa de caspasa 3 en CE a distintos tiempos, en presencia de medio condicionado tumoral de MG63 (MC ■), medio sin suero (MF ■), o medio con 20% SFB (■). * $p < 0.05$ respecto a MC.

Estos resultados nos llevaron a plantear una hipótesis de trabajo directa, vg, que el estímulo de las vías dependientes de AKT y MAPK podría explicar el efecto protector del MC. Como se verá más adelante, esta hipótesis resultó insuficiente y, en el caso de CE en suspensión, no aplicable.

4.2. Efecto del MC de MG63 sobre la supervivencia endotelial frente a muerte por desarraigo

En procesos tales como la posible reendotelización a partir de CE circulantes o la metastatización, la pérdida de sensibilidad a la muerte por desarraigo de las CE se convierte en un elemento clave. Por tanto, examinamos la influencia del microambiente tumoral y, específicamente, el VEGF.

Para ello, se pretrató la monocapa de CE a modo de reproducir lo que ocurre normalmente *in vivo*, cuando las CE están recibiendo estímulos del medio que las rodea y posteriormente pierden sus uniones y se desencadena la muerte por desarraigo. Las células cultivadas en suspensión se recogieron a los tiempos indicados y se determinó la muerte celular por citometría de flujo.

En primer lugar, observamos el efecto que tiene el MC de MG63 sobre la supervivencia endotelial a anoikis. El pretratamiento de las CE con este MC induce una disminución de la muerte endotelial cuando las CE son levantadas y mantenidas en suspensión frente a las pretratadas con MF (Figura 7). Las células sometidas a un pretratamiento con el medio de crecimiento con 20% SFB fueron las que presentaron una mayor tasa de supervivencia en suspensión. El paso siguiente, de acuerdo a lo observado en CE en monocapa y no desprendidas, fue analizar el efecto de VEGF. En este experimento, el resultado fue sustancialmente distinto a lo esperado.

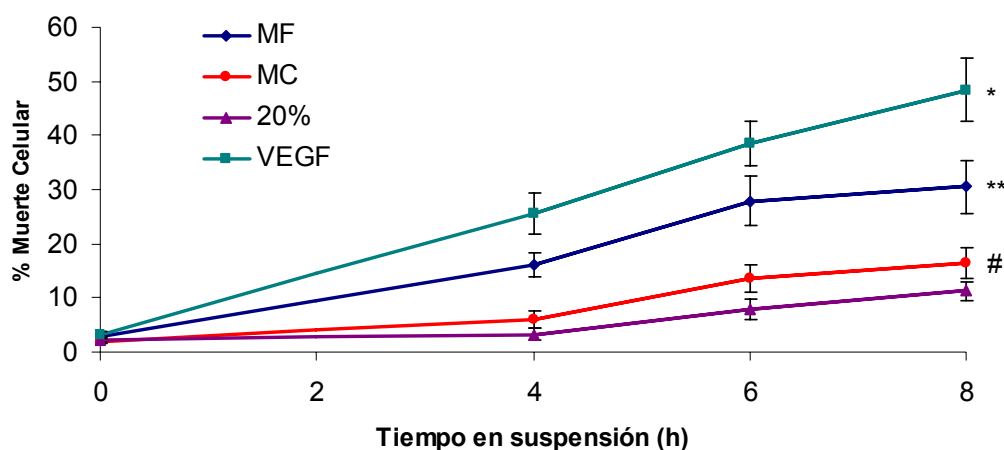


FIGURA 7: Análisis de la muerte celular por anoikis a distintos tiempos de cultivo en suspensión. Las CE se pretrataron durante 24h con los medios que se indican, se tripsinizaron y se cultivaron en MEM D-Val 1% SFB en pocillos de P6 tratados con Poly-HEMA. A los tiempos indicados, se recogieron las CE y se procesaron por citometría de flujo (* $p < 0,05$ ó $< 0,01$ con respecto a las demás curvas. ** $p < 0,01$ con respecto a las curvas inferiores. # $p < 0,05$ con respecto a la curva inferior). En este y los siguientes gráficos de este tipo y, a menos que haya indicación en contra, la significación se refiere a la diferencia estadística entre una línea y otra, determinada por ANOVA en cada punto de tiempo. Para simplificar la interpretación de la figura, los signos de significación se han colocado en cada curva y no en cada punto por separado.

4.3. Efecto del VEGF sobre la supervivencia endotelial frente a muerte por desarraigo

Al contrario de lo que podía esperarse en base al efecto protector del VEGF sobre CE en monocapa, el pretratamiento de las CE con VEGF (20 ng/ml) indujo un claro aumento de la muerte cuando las CE fueron levantadas y mantenidas en suspensión, mucho mayor incluso que en aquellas pretratadas sólo con MF (Figura 7).

Los efectos diferenciados del pretratamiento tanto con VEGF como con MC se mantuvieron hasta las 8 h. A partir de este tiempo, las diferencias disminuyeron, al producirse un incremento generalizado de la muerte celular, como consecuencia del desarraigo prolongado. Por esta razón a tiempos más largos, este tipo de ensayo pierde sensibilidad para analizar comparativamente los efectos de diferentes tratamientos.

Para ver la influencia que tendría el VEGF en el efecto del MC de MG63, se emplearon anticuerpos específicos frente a VEGF (1 μ g/ml) o frente a su receptor principal VEGFR2/KDR (mAb 3.83, Imclone) (0,5 μ g/ml) durante el pretratamiento con el MC. El porcentaje de muerte fue menor en aquellas células que se pretrataron con los anticuerpos inhibidores del efecto de VEGF (Figura 8). Por tanto, este resultado indica una implicación del VEGF en este fenómeno.

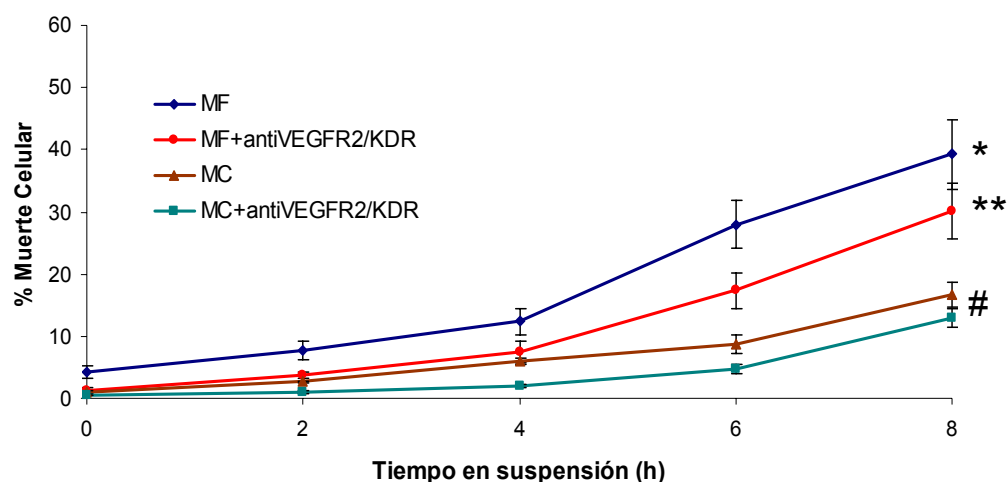


FIGURA 8: Análisis de la muerte celular por anoikis. Las CE se pretrataron con MF o MC en presencia/ausencia de un anticuerpo bloqueante de VEGFR2 (antiVEGFR2/KDR) durante 24h. Se tripsinizaron y se cultivaron en suspensión en MEM D-Val 1% SFB durante los tiempos indicados, tras los cuales se recogieron y se procesaron por citometría de flujo (* $p < 0,05$ ó $p < 0,01$ con respecto a las demás curvas. ** $p < 0,01$ con respecto a las curvas inferiores. # $p < 0,05$ con respecto a la curva inferior).

Una vez identificado el efecto favorecedor del VEGF sobre la muerte por desarraigo, se hizo un análisis más exhaustivo. En primer lugar, se realizó una curva de concentraciones de VEGF en pretratamiento, a partir de la cual produjera un efecto de incremento de la letalidad en CE en suspensión. Concentraciones inferiores a 2 ng/ml no aumentaron la muerte en suspensión, que se incrementó en forma dosis/respuesta a partir de concentraciones iguales o superiores a 2 ng/ml (Figura 9).

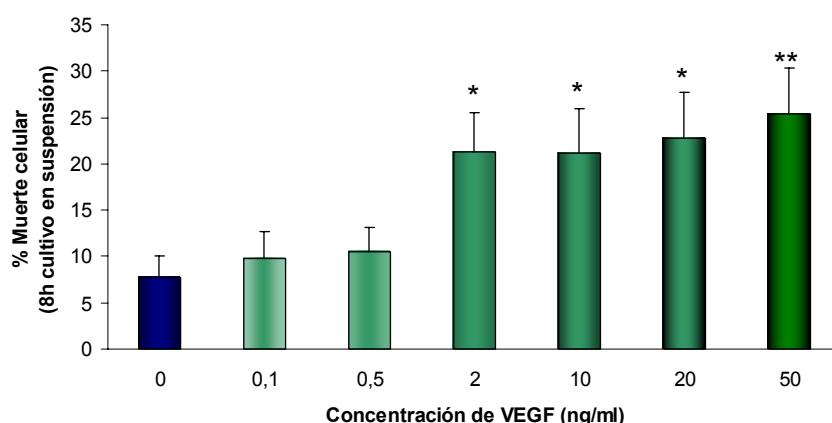


FIGURA 9: Análisis de la muerte celular por anoikis en CE tratadas con concentraciones crecientes de VEGF durante 24h. Se tripsinizaron y se cultivaron en suspensión en MEM D-Val 1% SFB durante 8h, cuando se recogieron y se procesaron por citometría de flujo (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al basal).

Igualmente, se analizó si otros miembros de la familia de VEGF e incluso otros factores de crecimiento relacionados o no relacionados estructuralmente, tenían los mismos efectos sobre la muerte en suspensión que el VEGF-A. Para ello, se pretrató a las CE con la misma concentración (20 ng/ml) de factor de crecimiento placentario (PIGF), VEGF-D o factor de crecimiento epidérmico (EGF). Con respecto al PIGF, se observó un efecto deletéreo mayor que el visto con VEGF-A a igual concentración, provocando mayor muerte celular en suspensión; sin embargo, VEGF-D no fue capaz de asemejar el efecto del VEGF-A y no aumentó significativamente el porcentaje de muerte celular respecto al MF. En cuanto a EGF, no tuvo efecto sobre la muerte celular en suspensión, manteniendo los porcentajes de muerte celular en niveles similares al MF (Figura 10).

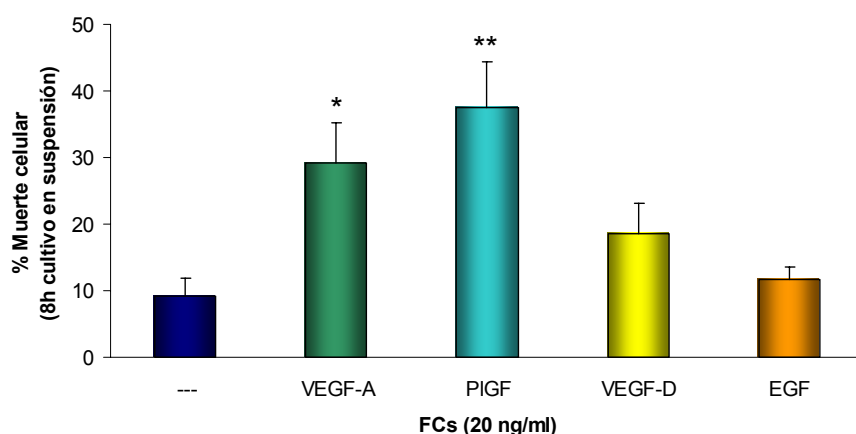


FIGURA 10: Análisis de la muerte celular por desarraigo. Las CE se trataron con factores de crecimiento (FCs) a una concentración de 20 ng/ml durante 24h. Posteriormente, se tripsinizaron y se cultivaron en suspensión en MEM D-Val 1% SFB durante 8h, cuando se recogieron y se procesaron por citometría de flujo (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al basal).

Con el fin de determinar qué rutas de señalización estaban implicadas en este efecto deletéreo del VEGF, se empleó una batería de experimentos en la que se pretrató con VEGF en presencia/ausencia de inhibidores específicos de distintas rutas de señalización. De los resultados solo detallamos aquellos en los que obtuvimos datos significativos.

4.3.1. Inhibición de PI3K/Akt

La ruta PI3K/Akt es crítica para la supervivencia endotelial; si bien se sabe que esta ruta no es funcional en CE en suspensión (40), desconocemos la influencia de su inhibición previa a la suspensión. Al pretratar las CE con VEGF en presencia de LY294002, un inhibidor específico de PI3K, observamos que se producía una reducción de la muerte celular inducida por el tratamiento con VEGF (Figura 11). Este resultado indicó, de forma definitiva, que el efecto deletéreo del VEGF sobre las CE en suspensión puede involucrar a AKT.

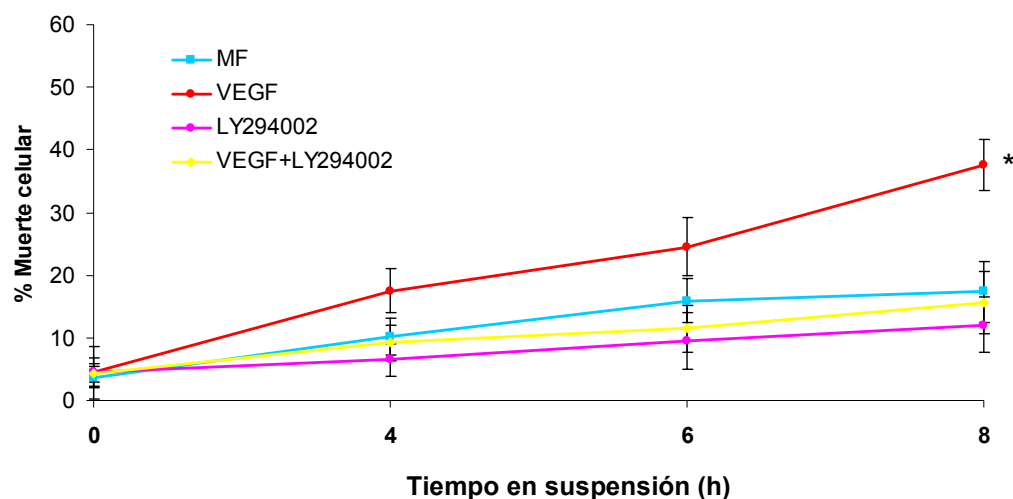


FIGURA 11: Análisis de la muerte celular por desarraigo en CE pretratadas con MF o VEGF en presencia del inhibidor específico de la ruta PI3K/Akt, LY294002, durante 24h. Tras tripsinizar las CE, se cultivaron en suspensión en MEM D-Val 1% SFB y se fueron recogiendo a los tiempos indicados, para su procesamiento por citometría de flujo (* $p < 0,01$ con respecto a las otras condiciones).

4.3.2. Inhibición de GSK3 β

La implicación del eje GSK3 β / β -catenina en el mecanismo de la muerte celular por desarraigo ha sido descrito en otros tipos celulares. Sin embargo, en CE esta implicación no se ha estudiado previamente. Así, empleamos dos inhibidores diferentes de GSK3 β durante el pretratamiento para ver la implicación de esta ruta. Los resultados con LiCl o SB216763 demostraron una disminución significativa de la muerte celular inducida tanto por el pretratamiento con MF como la inducida por el pretratamiento con VEGF (Figura 12).

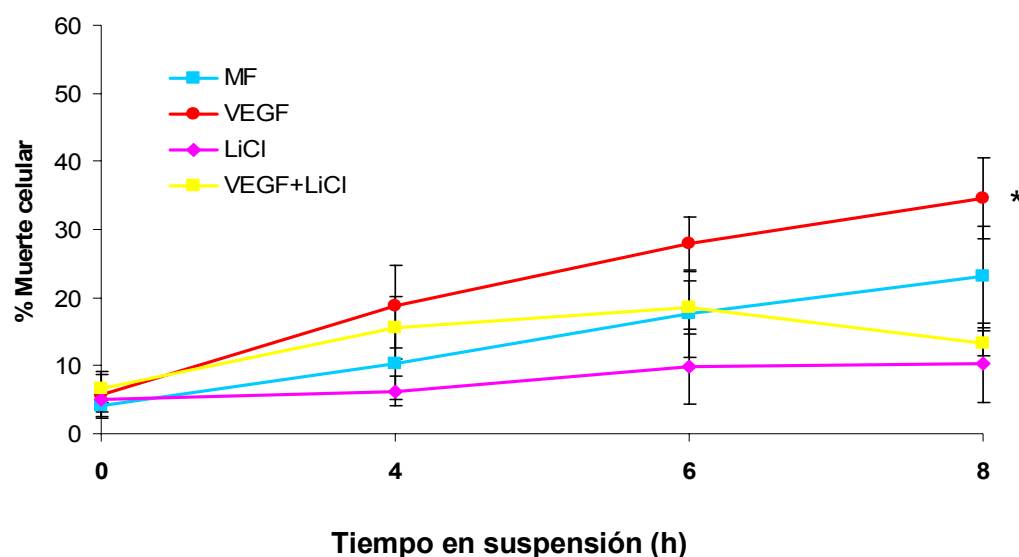


FIGURA 12: Análisis de la muerte celular por desarraigo en CE pretratadas con MF o VEGF en presencia del inhibidor específico de GSK3 β , LiCl, durante 24h. Tras tripsinizar las CE, se cultivaron en suspensión en MEM D-Val 1% SFB y se recogieron a los tiempos indicados, para su procesamiento por citometría de flujo (* $p < 0,01$ con respecto a las otras condiciones).

4.3.3. Inhibición de JAK2/STAT

Se ha implicado recientemente en la señalización por VEGF la ruta JAK2/STAT. Para ello, empleamos el inhibidor AG490, cuya especificidad se determinó mediante ensayo de retardo en movilidad electroforética de STAT3 en CE estimuladas con VEGF y mediante Western Blot empleando anticuerpos específicos frente a la forma fosforilada de JAK2). Al pretratar a las CE con AG490, ya sea en presencia como en ausencia de VEGF, se produjo un efecto no conocido previamente. Así, con cualquier pretratamiento, la inhibición de JAK2 con AG490 redujo la muerte celular a valores casi inapreciables, incluso inferiores a los obtenidos en CE pretratadas con medio de crecimiento con 20% de SFB y posteriormente cultivadas en suspensión (Figura 13). Tanto este resultado como los de los puntos anteriores no tienen antecedentes en la literatura.

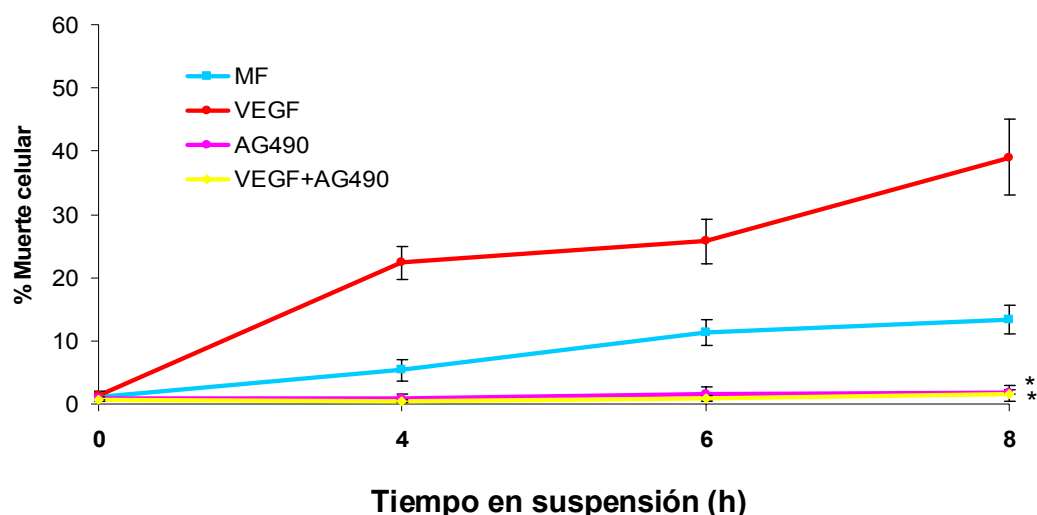


FIGURA 13: Análisis de la muerte celular por desarraigo en CE pretratadas con MF o VEGF en presencia del inhibidor específico de la ruta JAK2/STAT, AG490, durante 24h. Tras tripsinizar las CE, se cultivaron en suspensión en MEM D-Val 1% SFB y se recogieron a los tiempos indicados, para su procesamiento por citometría de flujo (* $p < 0,05$ respecto a sus controles).

La intensidad del efecto protector observado nos llevó a realizar un experimento complementario para reforzar la evidencia de que era específicamente JAK2 la vía implicada. Para ello, transfectamos a las CE con plásmidos que expresan una forma deficiente en el dominio quinasa de JAK2 (JAK2-DK) o una forma “wild type” (JAK2-WT) (cedidos por el Dr. Dwayne L Barber, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canadá). Como se ve en la figura 14, las CE transfectadas con la forma JAK2-DK presentaban un porcentaje de muerte celular a las 8 h de cultivo en suspensión significativamente menor con respecto a las transfectadas con la forma JAK2-WT o con el vector vacío. Este resultado es de máxima importancia, al corroborar que las observaciones con AG490 correspondían a efectos mediados por JAK2.

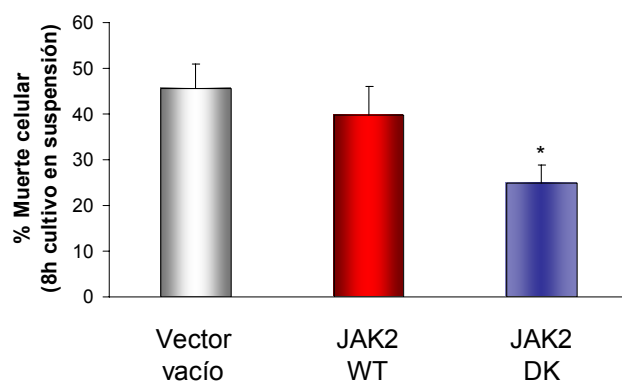


FIGURA 14: Análisis de la muerte celular por anoikis tras 8 h de cultivo en suspensión de transfectadas con una forma “wild-type” (JAK2-WT) o una forma deficiente en el dominio quinasa de JAK2 (JAK2-DK). Tras 24h de tratamiento con MF, las CE se tripsinizaron y se cultivaron en suspensión, reuniéndolas a las 8h y procesándolas por citometría de flujo. Como control de la transfección, se empleó un vector vacío (* $p < 0,05$ respecto a las otras condiciones).

4.4. Efecto del AG490 sobre la muerte por desarraigo

Como hemos enunciado, el efecto protector de la inhibición de JAK2 en este tipo de sistema experimental es completamente nuevo, por lo que nos propusimos analizarlo más detenidamente.

Mediante el análisis de la fragmentación del ADN se comprobó que la muerte por suspensión es debida en forma sustancial a apoptosis y por lo tanto, era encuadrada en la definición de anoikis. Nuevamente, un dato muy relevante fue la inhibición de esta anoikis por AG490 (Figura 15).

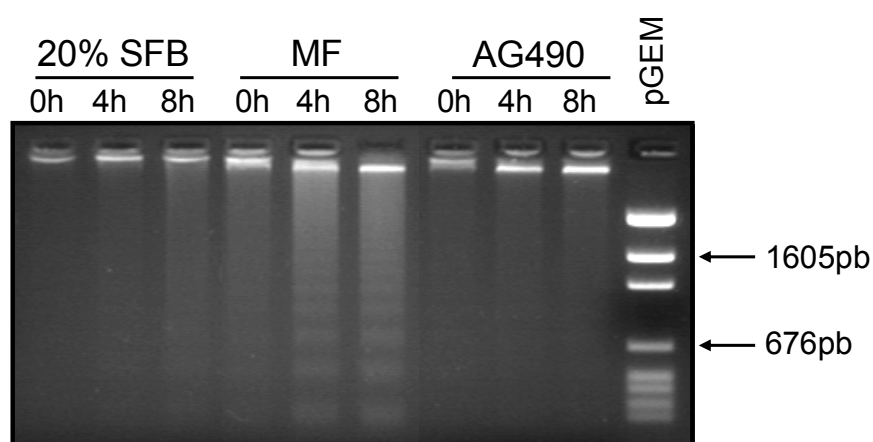


FIGURA 15: Análisis de la fragmentación del ADN en CE pretratadas con MF+20% SFB, MF o MF +AG490 durante 24h y posteriormente cultivadas en suspensión. A los tiempos indicados (0, 4 y 8 h de cultivo en suspensión), se recogieron las CE y se procesaron para la extracción de su ADN. El último carril (pGEM) corresponde al marcador de peso molecular.

Quisimos ver el perfil temporal del efecto protector del AG490, ya que habíamos observado que, cualquiera que fuera el pretratamiento anterior al cultivo en suspensión, transcurridas 24 h de suspensión, las cifras de muerte celular tienden a igualarse. Además, dada la dificultad de medir muerte celular en células que llevan un gran periodo de tiempo en suspensión (por la cantidad de restos celulares), empleamos un diseño experimental basado en determinar la eficacia de una resiembra sobre Matrigel. Además, este diseño daría una primera pista sobre el grado de preservación de propiedades funcionales por parte de las CE en suspensión y, en otros términos, podría ser indicativo de la eficacia en procesos de reendotelización con CE adultas, de posible aplicación *in vivo*.

Se recogieron CE cultivadas en suspensión durante tiempos prolongados y se sembraron sobre Matrigel. Tras 24 h de crecimiento, se fijaron y contaron. Como

resultado, obtuvimos que aquellas CE pretratadas con AG490 antes de la suspensión presentaban una eficacia de resiembra muy superior a la obtenida con MF. Este aspecto se prolongaba durante un largo periodo, pues el incremento de la eficacia de resiembra persistió aún tras 48 h de cultivo en suspensión (Figura 16).

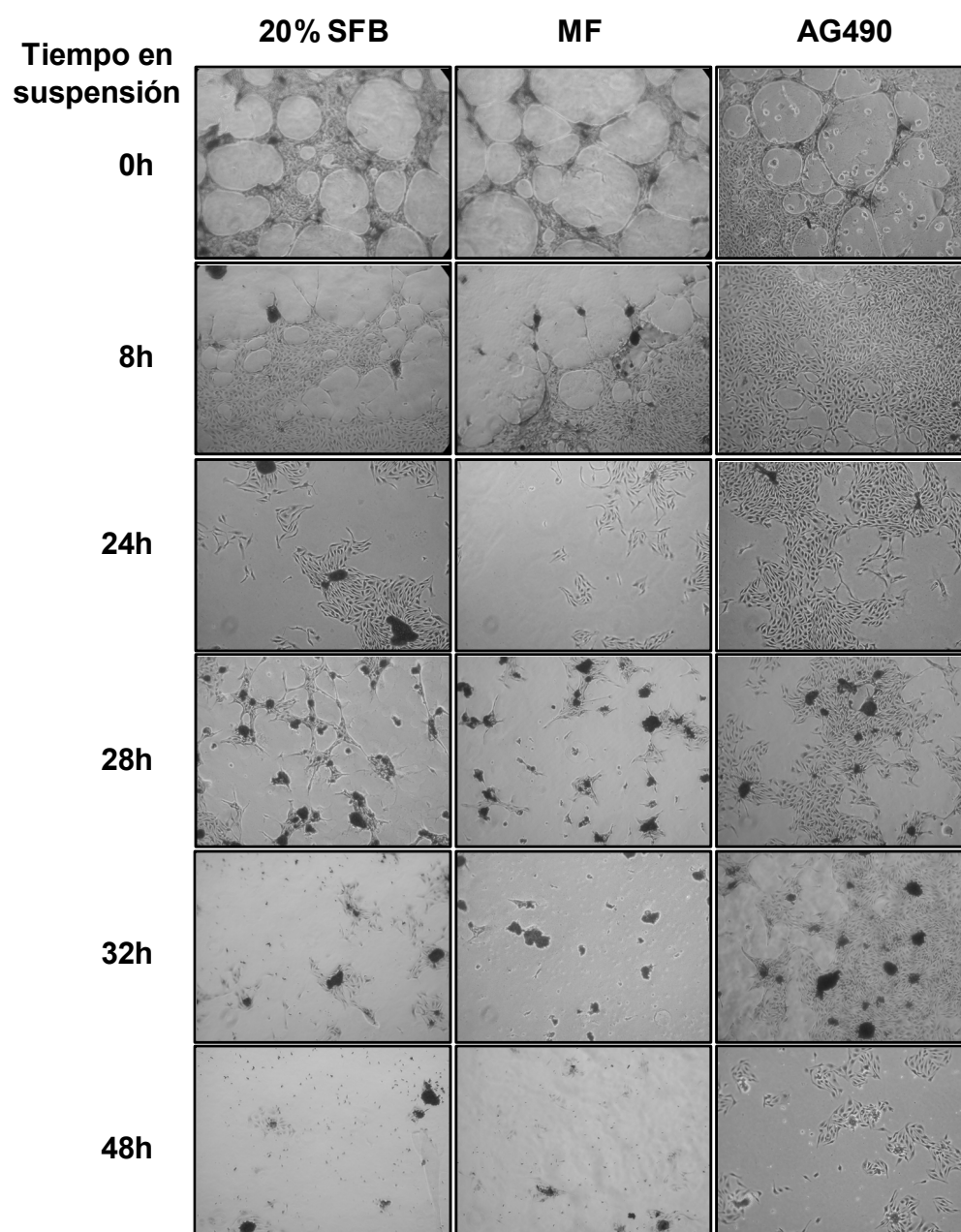


FIGURA 16: Microfotografías (100x) de CE pretratadas con MF+20% SFB, MF o MF+AG490 durante 24h y posteriormente cultivadas en suspensión durante los tiempos indicados en la columna de la izquierda. Tras este tiempo, las CE se recogieron y se resembraron sobre pocillos tratados con Matrigel, permitiéndolas crecer durante 24h. En ese momento, se fijaron, se tiñeron con cristal violeta y se fotografiaron.

El interés de este método radica en que permite ver propiedades concretas, vg, la capacidad de crecimiento tras resiembra, algo que la citometría de flujo no permitiría caracterizar. Por otra parte, y también a diferencia de la citometría de flujo, el ensayo de resiembra es eficaz para valorar la potencialidad de los pequeños grupos de CE que sobreviven a largos periodos en suspensión. Como se ve, esta potencialidad es mayor que lo que podría suponerse basándonos exclusivamente en la citometría de flujo.

4.4.1. Estudio de mecanismos: Protección por AG490

Los estudios de mecanismos implicados se llevaron a cabo mediante el análisis por Western Blot de distintos marcadores de supervivencia (Figura 17). Los resultados mostrados en las figuras 17 y 18 corresponden a CE en suspensión.

El primer estudio se centró en la actividad de la ruta PI3K/Akt, por lo que se extrajeron proteínas de CE cultivadas en suspensión durante 0, 4 y 8 h y se analizaron por Western Blot. Obtuvimos dos resultados relevantes:

- 1) Una activación sostenida de Akt durante el cultivo en suspensión, determinado por la detección de la forma fosforilada de Akt (Figura 17).
- 2) Un incremento de la cantidad total de Akt presente en las CE (Figura 17).

En los mismos lisados celulares se analizó el estado de activación/inactivación de uno de los sustratos conocidos de Akt: GSK3. Se midieron, mediante Western Blot, los niveles de GSK3 α y β fosforilados, correspondientes a formas inactivas, observándose un aumento de la fosforilación de GSK en CE cultivadas en suspensión tras pretratarlas con AG490. Este efecto va en consonancia con el aumento de Akt fosforilado descrito más arriba (Figura 17). Este resultado, también nuevo en la literatura, dio lugar a una serie de experimentos relacionados.

Hay que indicar que el pretratamiento con MF+20% SFB (que presenta una reducción del porcentaje de muerte en suspensión respecto al medio fresco) compartía algunos mecanismos con la protección por pretratamiento con AG490. Así, se observan trazas de Akt fosforilado en CE en suspensión y una mayor cantidad de β -catenina nuclear en estas células. Sin embargo, no se vio inactivación de GSK3 α/β con el SFB (Figura 17), lo que indica una diferencia sustancial en los mecanismos entre uno y otro tratamiento.

Por último, como habíamos observado anteriormente un aumento de la supervivencia mediante inhibidores de GSK3 β (LiCl y SB216763), y siendo conocida la implicación del eje GSK3 β / β -catenina en el fenómeno de muerte por desarraigo, nos centramos en el estudio de la β -catenina en CE cultivadas en suspensión. El Western Blot de la β -catenina nuclear mostró una mayor cantidad de esta proteína en CE pretratadas con AG490, que además se mantenía a lo largo del cultivo en suspensión (Figura 17). Este resultado, también completamente nuevo, dio pie a una serie de experimentos relacionados.

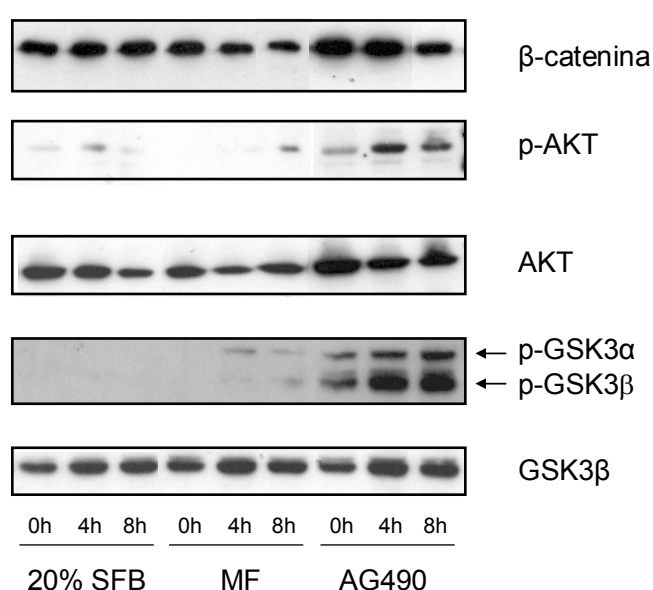


FIGURA 17: Western blots de lisados totales de CE pretratadas con MF+20% SFB, MF o MF+AG490 durante 24h y cultivados posteriormente en suspensión durante los tiempos indicados. Se recogieron las CE y se lisaron para obtener las proteínas. Los anticuerpos empleados reconocen específicamente las formas fosforiladas de Akt y GSK3 α/β , así como la β -catenina. También se emplearon anticuerpos que reconocen Akt y GSK3 β independientemente de su estado de fosforilación.

Una primera impresión sugería que este incremento en las CE que más sobreviven se debía a aumentos inducidos por el pretratamiento (ver apartado 4.5.1).

Con objeto de determinar si un incremento de β -catenina inducía por sí mismo un aumento en la supervivencia, se transfectó a las CE con un plásmido que expresaba β -catenina. Como se ve en la figura 18, el aumento de la expresión de β -catenina aumenta la supervivencia endotelial tras 8 h de cultivo en suspensión, comprobándose, por primera vez en CE, la relación entre un aumento de β -catenina y una disminución en la muerte por desarraigo.

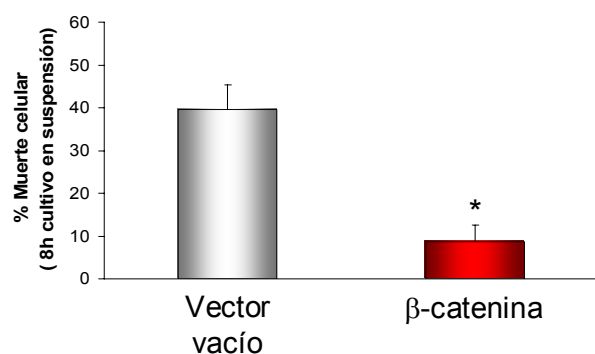


FIGURA 18: Análisis de la muerte celular por desarraigo tras 8 h de cultivo en suspensión de CE transfectadas con un plásmido que incrementa la expresión de β -catenina. Tras 24h de tratamiento con MF, las CE se tripsinizaron y se cultivaron en suspensión, recogiénolas a las 8h y procesándolas por citometría de flujo. Como control de la especificidad del efecto de la transfección de β -catenina, se empleó un vector vacío (* $p < 0,05$ respecto al vector vacío).

4.5. Efecto del AG490 en otros modelos de daño endotelial

A la vista de la capacidad de AG490 de inhibir drásticamente la muerte por desarraigo, tan solo igualada en otros tipos celulares por la sobreexpresión de algunos oncogenes y/o moléculas de supervivencia, nos planteamos la posibilidad de que esta inhibición también protegiera frente a otros daños que ocurren sobre el endotelio en su estado habitual en monocapa y confluyente, como el estrés oxidativo o el cultivo en ausencia de suero. Por ello, se emplearon modelos de daño endotelial en los que la ruta JAK2/STAT y, más concretamente, su inhibición por AG490, pudiera estar implicada. Todos estos modelos se realizaron ya sobre CE confluentes y en monocapa.

4.5.1. Protección frente a la ausencia de suero

Uno de los modelos clásicos de daño endotelial es el cultivo en ausencia de suero. En este modelo, quisimos determinar si el pretratamiento con AG490 era capaz de proteger al endotelio, por lo que tratamos con diferentes concentraciones de AG490 y medimos el daño endotelial mediante liberación de LDH. Los resultados indicaron que un pretratamiento con AG490 10 μ M era capaz de proteger al endotelio de la muerte inducida por el cultivo sin suero y esto se determinó tanto a las 24 h como a las 48 h. Esta protección se comparó a la obtenida al pretratar con VEGF, tomado como paradigma de acción protectora sobre el endotelio (Tabla 4).

TABLA 4

AG490 (μ M)	% Muerte celular (24h)	% Muerte celular (48h)
0	100,00 \pm 4,36	150,21 \pm 6,22
1	100,93 \pm 3,20	137,80 \pm 4,29
10	78,19 \pm 5,06*	115,96 \pm 4,10
25	58,90 \pm 2,28*	78,17 \pm 4,01*
50	57,08 \pm 1,12*	69,16 \pm 3,19*
100	57,40 \pm 1,25*	61,52 \pm 2,61*
VEGF	50,10 \pm 2,38	55,02 \pm 3,07

TABLA 4: Efecto protector de la inhibición de JAK2 sobre la muerte celular inducida por cultivo en ausencia de suero. Las CE se trataron durante 48h en presencia de diferentes concentraciones de AG490 y se determinó la muerte celular mediante liberación de LDH tanto a 24 como a 48h. El 100 % de muerte celular se estableció a la obtenida en CE tratadas sólo con MF a las 24h.

Entre los mecanismos involucrados en esta protección, quisimos estudiar, en base a la literatura previa (ver apartado 1.4) y a nuestros propios resultados con CE en suspensión, la implicación de la β -catenina. Mediante Western blot y microscopía confocal, observamos que se producía un aumento y una redistribución de la β -catenina en CE tratadas con AG490, encontrándose no solo asociada a la membrana sino también libre en el citoplasma. Estos cambios son similares a los obtenidos empleando un control positivo para el incremento de β -catenina, como el tratamiento con LiCl e incluso con un tratamiento protector no específico, como es el cultivo con medio+20% SFB (Figura 19A).

Una vez comprobado el incremento de β -catenina y de su translocación nuclear, quedaba por dilucidar su valor funcional. Con este fin, se realizaron dos aproximaciones; en la primera se realizó el análisis de la actividad de β -catenina, comprobándose un aumento de la actividad transcripcional de inducida por β -catenina (mediante ensayo TOP/FOP) y dependiente del tratamiento con AG490. Este incremento fue más marcado cuando se sobreestimuló el sistema mediante cotransfección de las CE con un plásmido inductor sobreexpresión de β -catenina (Figura 19B). En una segunda aproximación, se determinó mediante Western Blot que la inhibición con AG490 inducía un aumento de la cantidad de β -catenina nuclear activa (defosforilada en Ser⁴⁷ y Thr⁴¹) (Figura 19D).

Asociado a este incremento, redistribución y aumento de actividad de la β -catenina, se observó un incremento de PECAM-1 en CE tratadas con AG490; este aumento fue, incluso superior al observado en CE tratadas con medio+20% SFB (Figura 19C).

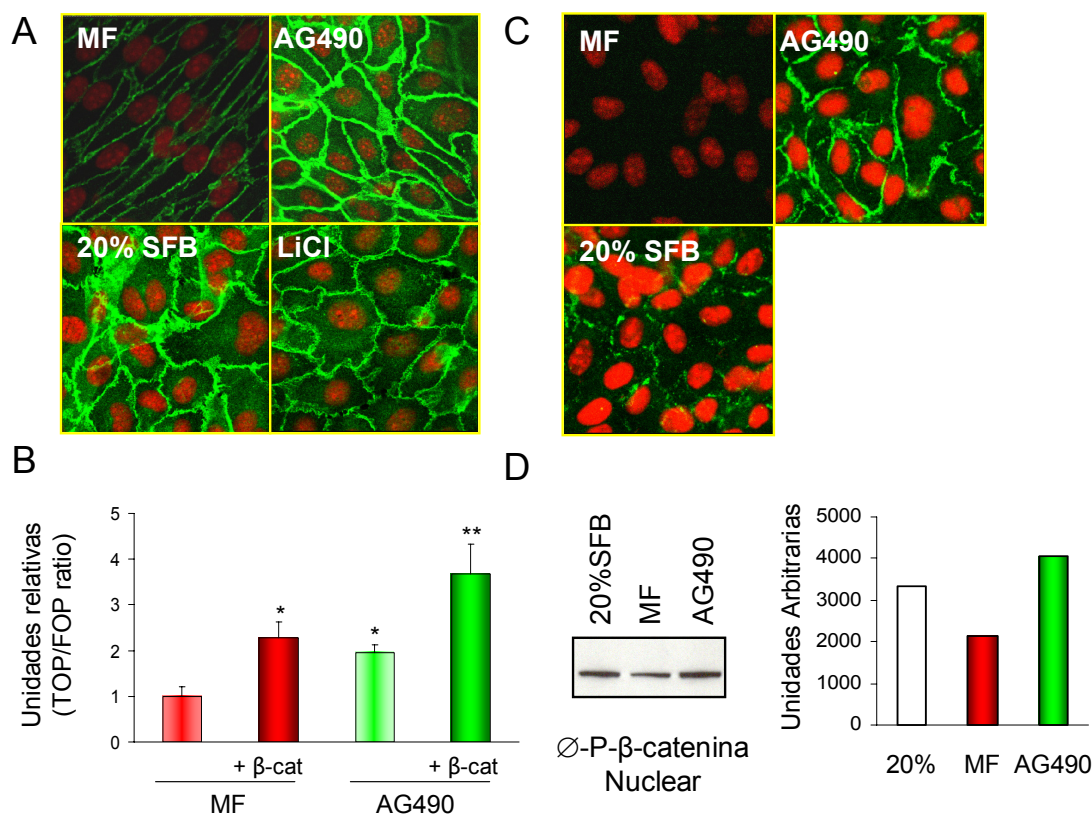


FIGURA 19: **A:** Microfotografías confocales (400x) de CE tratadas con MF+20% SFB, MF o MF+AG490 durante 24h. Se observaron tanto cambios en la cantidad como en la distribución de β -catenina (verde) causados por los tratamientos. El inhibidor de GSK3 β , LiCl, se empleó como control positivo de los cambios en cantidad y distribución de β -catenina. Se empleó yoduro de propidio (IP) para la visualización de los núcleos. **B:** Ensayo de la actividad transcripcional de β -catenina mediante gen reportero de luciferasa. Las CE se transfectaron con plásmidos que portan sitios de unión LEF/TCF de tipo “wild-type” o mutante (TOP/FOP) asociados al gen de la luciferasa y se sometieron a los distintos tratamientos (MF o MF+AG490) durante 24h. Donde se indica + β -cat, se cotransfectó con un plásmido que expresa β -catenina para determinar el máximo del método experimental. **C:** Microfotografías confocales (400x) de CE tratadas con MF+20% SFB, MF o MF+AG490 durante 24h, observándose un incremento en la cantidad de PECAM-1. Para el contraste nuclear, se empleó yoduro de propidio. **D.** Análisis, mediante Western Blot, de la cantidad de β -catenina activa que se localiza en el núcleo. Para ello, se empleó un anticuerpo específico para β -catenina defosforilada (ϕ -P) en Ser⁴⁷ y Thr⁴¹. A la derecha se muestra la cuantificación de las bandas obtenidas.

4.5.2. Protección frente a estrés oxidativo

Por su localización, el endotelio está particularmente expuesto al efecto lesivo de ROS. Existen numerosos estudios analizando el daño endotelial por ROS (29;74). En

años recientes, la evidencia relacionando la ruta JAK2/STAT con daño por ROS en otros tipos celulares ha reforzado la idea de que se trata de una vía significativamente involucrada en la respuesta celular a la agresión oxidativa. En concreto, la importancia de esta ruta en la respuesta del endotelio a los ROS queda aún por establecer.

Con el fin de estudiarla, diseñamos una serie de experimentos para ver la implicación de JAK/STAT y los posibles mecanismos implicados. En primer lugar, realizamos una medida del daño endotelial por radicales libres mediante liberación de LDH tras un tratamiento con H_2O_2 o con Xantina Oxidasa/Hipoxantina.

Como puede verse en la figura 20A, el tratamiento con H_2O_2 provocó un daño significativo en las CE; sin embargo, el pretratamiento con AG490 revirtió este daño hasta valores similares a los del control. Cuando la concentración de H_2O_2 se elevó hasta valores más tóxicos (1 mM), el pretratamiento con AG490 fue aún capaz de reducir significativamente la muerte, aunque no de devolverla hasta valores basales.

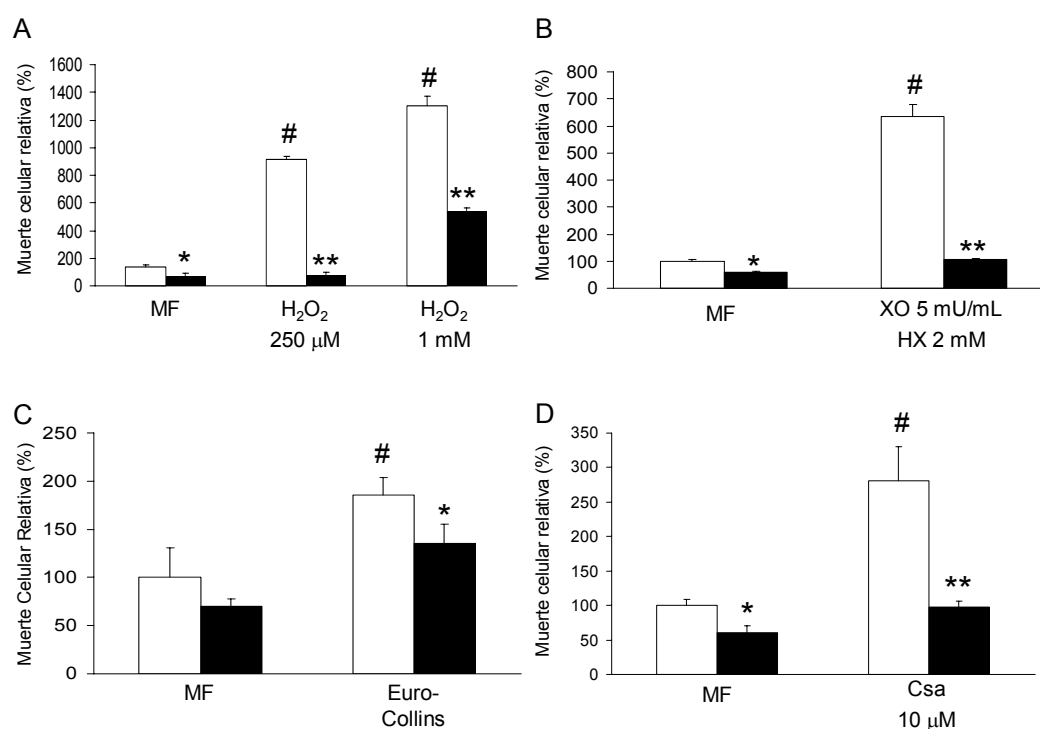


FIGURA 20: Efecto citoprotector de la inhibición de JAK2 con AG490 frente a estrés oxidativo. Las CE se trataron durante 24h con diversos agentes prooxidativos (H_2O_2 , XO/HX, medio de conservación de órganos para trasplantes EuroCollins, CsA) en presencia/ausencia del inhibidor específico de JAK2, AG490. Las barras claras representan las CE tratadas con el vehículo y las barras oscuras, las tratadas con AG490. La muerte celular se determinó por liberación de LDH. El 100% de muerte celular se estableció para las CE tratadas sólo con MF (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto a las CE tratadas con vehículo. # $p < 0,01$ con respecto a las CE no tratadas con agente oxidante).

En otra serie de experimentos, se empleó el sistema Xantina Oxidasa/Hipoxantina como donante de radical superóxido. Este sistema fue puesto a punto con anterioridad en el Laboratorio, produciendo una cantidad lesiva controlada (44). En este caso, el pretratamiento con AG490 igualmente protegió frente al daño por estrés oxidativo (Figura 20B).

Como ejemplo de una posible aplicación práctica empleamos el medio de conservación de órganos para trasplantes EuroCollins, que provoca daño celular por generación de ROS (93). Como puede verse en la figura 20C, la exposición al medio EuroCollins provocó daño celular endotelial, que se redujo significativamente en las CE que se habían pretratado con AG490.

En la misma línea de posibles aplicaciones prácticas en la citoprotección ante agentes farmacológicos en uso causantes de daño oxidativo, empleamos ciclosporina A (CsA), inmunosupresor empleado habitualmente en pacientes transplantados, que tiene un efecto citotóxico sobre las CE, también mediado por la generación de ROS (73). Empleando una dosis de CsA citotóxica para el endotelio (10 μ M), establecida según datos previos del Laboratorio, observamos que las CE tratadas con CsA+AG490 presentaban significativamente una mayor supervivencia que aquéllas tan solo tratadas con CsA (Figura 20D).

Con objeto de comprobar la especificidad del resultado obtenido, empleamos de nuevo los plásmidos que expresan la forma deficiente en el dominio quinasa de JAK2 (JAK2-DK) o la forma “wild type” (JAK2-WT). Al igual que con el inhibidor farmacológico AG490, las CE transfectadas con la forma deficiente de JAK2 presentaban una mayor tasa de supervivencia frente a las transfectadas con la forma “wild-type” o con el vector vacío (Figura 21)

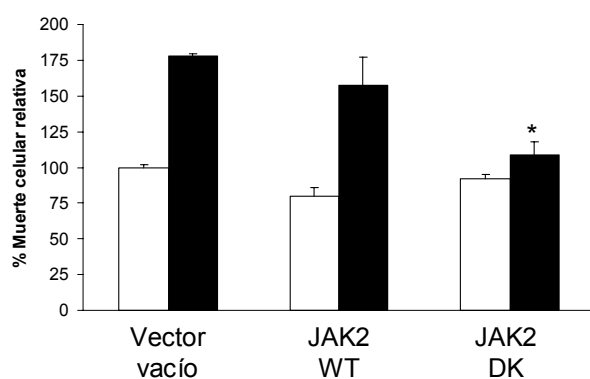


FIGURA 21: Efecto citoprotector frente a estrés oxidativo de la inhibición de JAK2 mediante transfección con una forma deficiente de JAK2 (JAK2-DK). Las CE se transfectaron con una forma “wild-type” (JAK2-WT) o una forma deficiente en el dominio quinasa y se expusieron durante 24h a vehículo (barras claras) o H₂O₂ 250 μ M (barras oscuras). La muerte celular se determinó por citometría de flujo (* $p < 0,05$ con respecto a las CE transfectadas con los otros plásmidos).

La influencia del ratio Bcl-2/Bax en la muerte por estrés oxidativo fue descrita con anterioridad en otros tipos celulares; sobre esta base, analizamos la influencia de este mecanismo en las CE. Mediante Western blot y posterior cuantificación de la intensidad de las bandas, determinamos que el H_2O_2 producía una reducción del ratio Bcl-2/Bax (situación proapoptótica); el pretratamiento en presencia de AG490 incrementaba este ratio hasta valores propios de una situación antiapoptótica. Esta medida se realizó tan solo tras 1 h de estímulo con H_2O_2 , puesto que los cambios en la relación Bcl-2/Bax son sucesos tempranos en el proceso de muerte celular inducida por estrés oxidativo (Figura 22A y B).

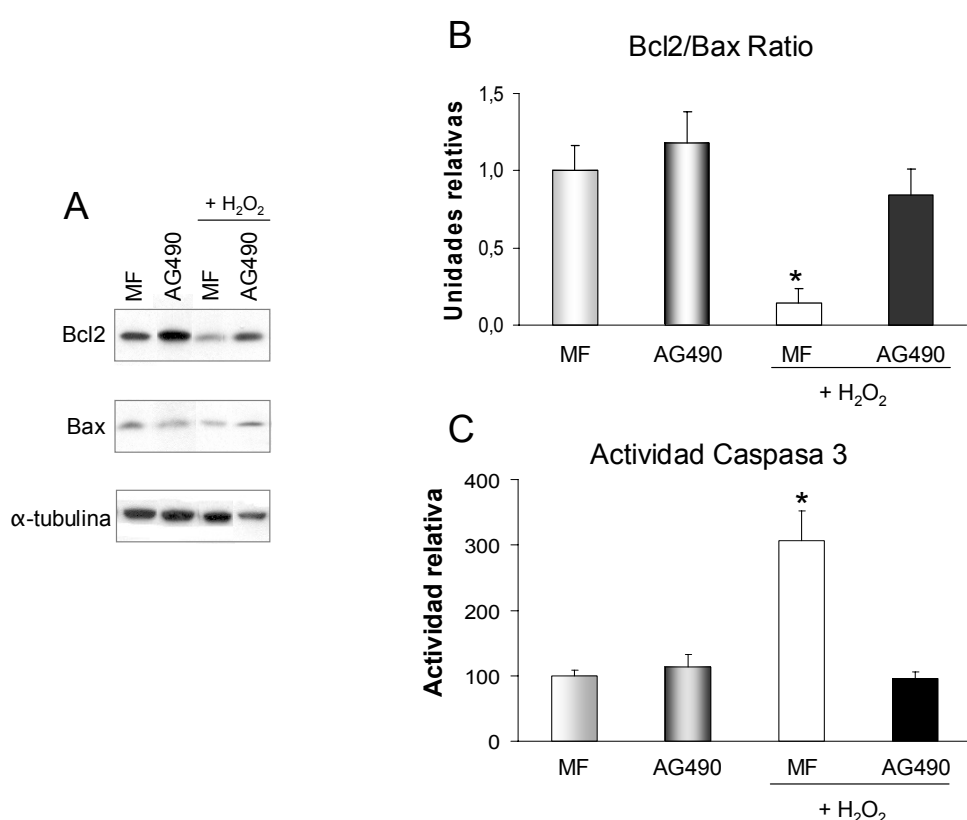


FIGURA 21: **A:** Western blots de lisados totales obtenidos de CE tratadas con MF o MF+AG490 en presencia de H_2O_2 durante 1h. Los anticuerpos empleados reconocen la proteína antiapoptótica Bcl-2 y la proteína proapoptótica Bax. Se empleó α -tubulina como control de carga. **B:** Medida del ratio Bcl-2/Bax mediante cuantificación de la intensidad de las bandas obtenidas en el Western Blot. **C:** Medida de la actividad de la caspasa 3 mediante ensayo fluorimétrico. Las CE se trataron con MF o MF+AG490 en presencia/ausencia de H_2O_2 durante 24h. A este tiempo, se obtuvo el lisado y se empleó junto al sustrato fluorogénico. La actividad se relativizó con respecto a la concentración de proteínas de los lisados.

El mecanismo del proceso apoptótico inducido por H_2O_2 se abordó también por la medida de la actividad de la caspasa 3. Como se ve en la figura 22C, el tratamiento

con H_2O_2 induce un incremento significativo de esta actividad, que se revierte hasta niveles basales en presencia de AG490.

Finalmente, se realizó un análisis de la fluorescencia de la rodamina para determinar si el AG490 actúa principalmente bloqueando los mecanismos letales inducidos por estrés oxidativo y/o actúa también como antioxidante *per se* o como activador de mecanismos antioxidantes. Como puede verse en la figura 23, el tratamiento con AG490 produjo una reducción de los niveles de oxidación de la dihidrorodamina en condiciones basales. Este efecto del AG490 fue aún más evidente cuando se llevó el sistema a niveles oxidativos elevados, mediante el tratamiento con H_2O_2 (100 μM , para no saturar la fluorescencia); en este caso, el pretratamiento con AG490 impidió este aumento de la fluorescencia.

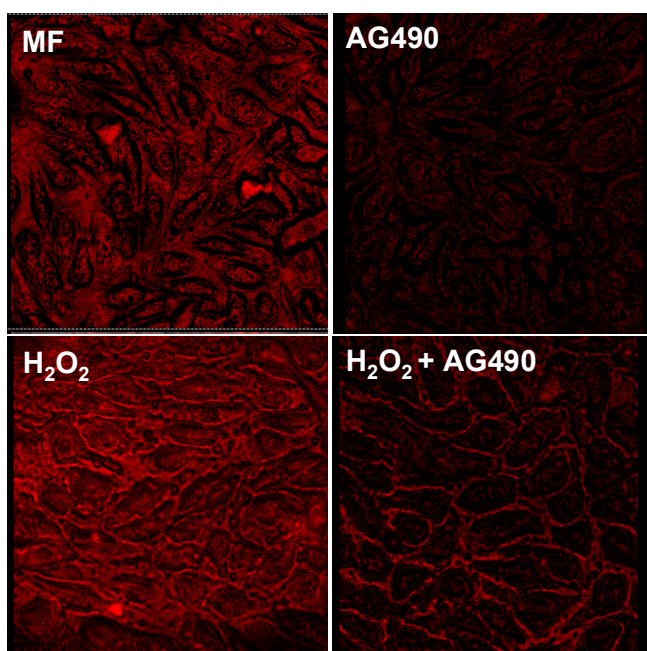


FIGURA 22: Microfotografías (200x) para el análisis de la capacidad antioxidante de AG490. Las CE se trataron, durante 1h, con MF o con H_2O_2 (100 μM) en presencia/ausencia de AG490. En los últimos 15 min de incubación, se añadió dihidrorodamina 123, sustrato que fluoresce cuando es oxidado a rodamina por las ROS. Tras finalizar los tratamientos, las CE se fijaron y se observaron por microscopía de fluorescencia.

Con objeto de comprobar si el efecto observado con AG490 era específico de la inhibición de la ruta JAK2/STAT, empleamos de nuevo los vectores para las formas dominantes “wild-type” o mutante. La figura 23 muestra que las CE transfectadas con la forma deficiente en el dominio quinasa de JAK2 (JAK2-DK) y que asemeja la misma acción que ejerce el AG490, presenta una reducción de los niveles de oxidación de la dihidrorodamina, tanto en condiciones basales como oxidativas, en presencia de H_2O_2 .

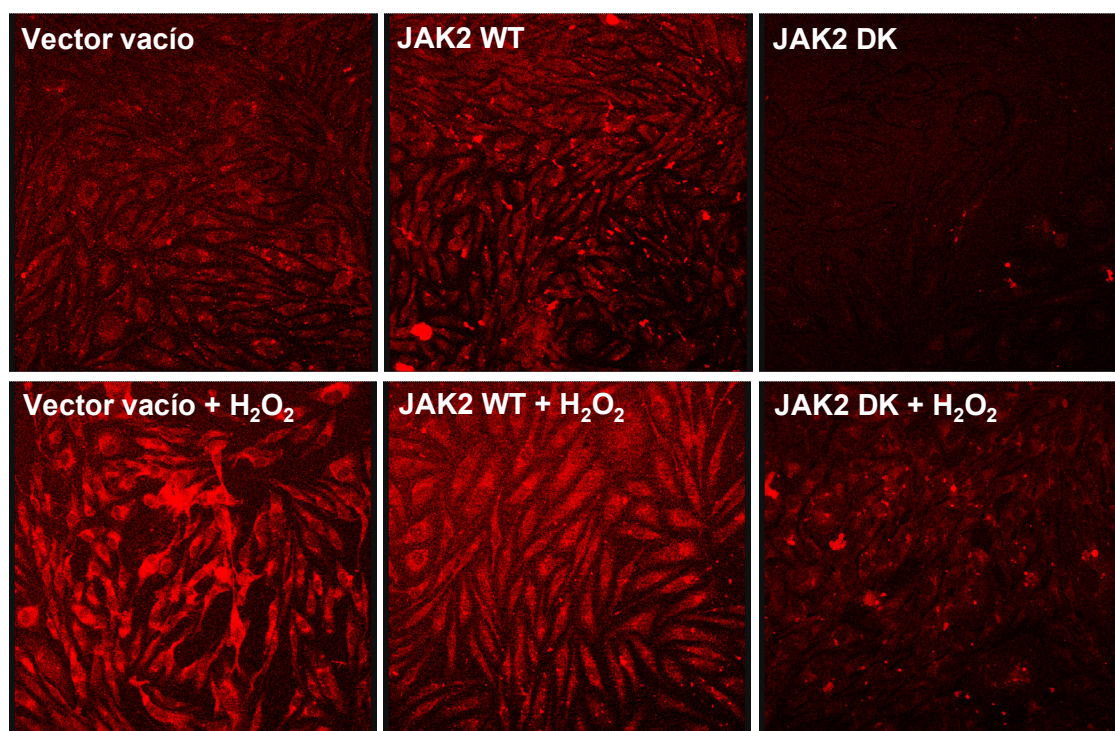


FIGURA 23: Microfotografías (100x) para el análisis de la capacidad antioxidante de la inhibición de JAK2. Las CE transfectadas con la forma “wild-type” (JAK2-WT), mutante (JAK2-DK) o con vector vacío se trataron, durante 1h, con MF (imágenes superiores) o con H₂O₂ 100 μM (imágenes inferiores). En los últimos 15 min de incubación, se añadió dihidrorodamina 123, sustrato que fluoresce cuando es oxidado a rodamina por las ROS. Tras finalizar los tratamientos, las CE se fijaron y se observaron por microscopía de fluorescencia.

4.5.3. Estudio *in vivo* de la protección frente a estrés oxidativo

Con objeto de determinar la posible protección del endotelio por la inhibición de JAK2 con AG490 frente al estrés oxidativo en un modelo *in vivo*, empleamos un modelo ya caracterizado en nuestro Laboratorio, basado en la administración de CsA (5). Como se muestra en la figura 24, el tratamiento con AG490 claramente redujo la tinción con lectina de las CE de los capilares peritubulares renales frente a la obtenida al emplear sólo CsA. La lesión de los capilares peritubulares es característica de la toxicidad por anticalcineurínicos (59;66).

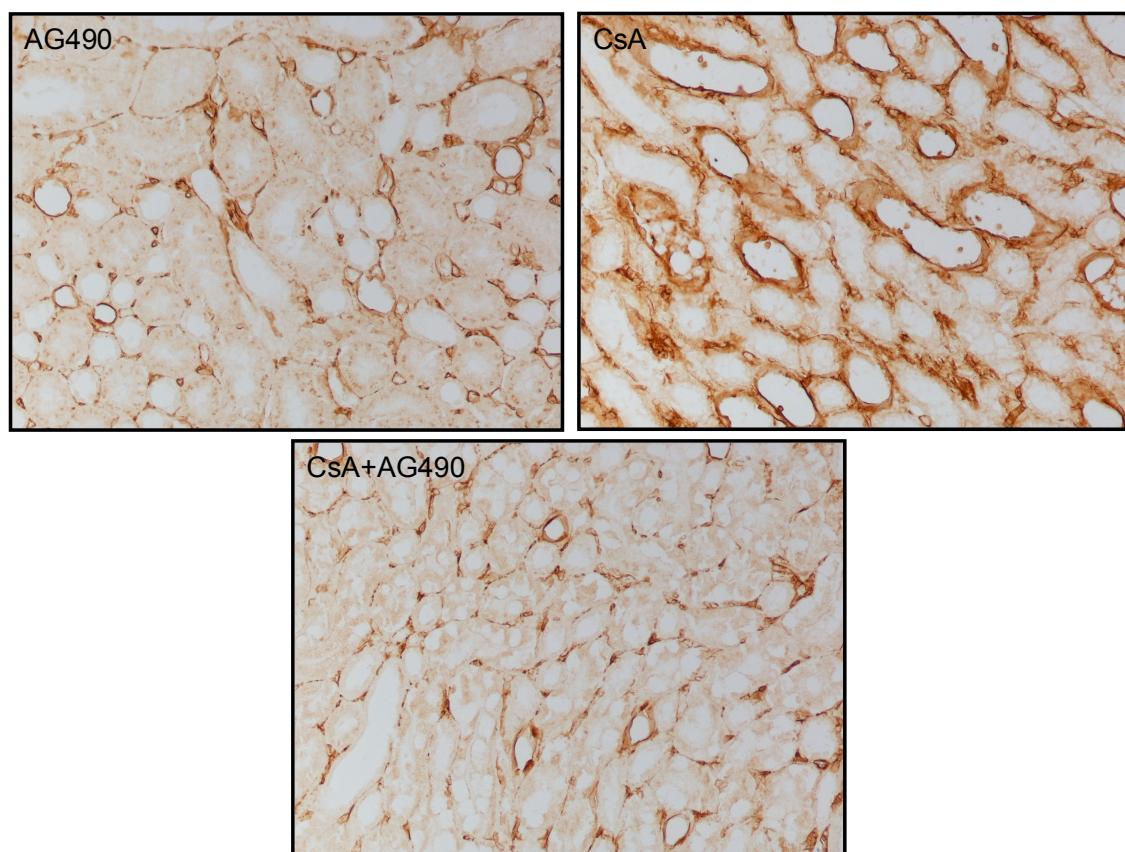


FIGURA 24: Microfotografías (200x) de los capilares peritubulares renales teñidos con la lectina *Bandeiraea simplicifolia* BS-I. El tratamiento con CsA+AG490 no se distingue del basal con AG490, mientras que la señal de la lectina es marcadamente superior en los riñones de ratones tratados con CsA. Los valores de intensidad de la lectina son: AG490=0,7±0,4; CsA=3,5±1,1*; CsA+AG490=1,1±0,2, *p<0.001 con respecto al resto de condiciones.

DISCUSIÓN

Esta discusión sigue el orden de presentación de los resultados, comenzando por los efectos protectores del MC tumoral, tanto en CE en monocapa como en suspensión, la influencia del VEGF en el fenómeno de muerte celular, y en particular, la relacionada con desarraigo y la importancia vital de la ruta JAK2/STAT y de su inhibición en la supervivencia endotelial frente a anoikis y daño oxidativo.

Los resultados previos del Laboratorio señalaban 2 hechos: uno, la capacidad protectora del MC de la línea tumoral MG63 sobre el endotelio confluyente, y dos, que esta protección era significativamente dependiente de VEGF (19). Los resultados presentados en las figuras 1 y 2 muestran los mecanismos de protección implicados, que incluyen tanto la activación de rutas de supervivencia celular, como PI3K/Akt o MAPK de manera tiempo dependiente, como la inhibición de la actividad de la caspasa 3, ejecutora de la apoptosis. Estos mecanismos son bien conocidos por su activación por VEGF y otros factores de crecimiento (83;111); sin embargo, sería necesario un análisis más exhaustivo para saber qué factores de crecimiento específicos son los causantes de la activación de estas rutas de supervivencia. En este punto, el interés de nuestro Laboratorio no se dirigía a la caracterización de los medios tumorales, sino a su utilización como herramienta para el estudio de propiedades de la CE. El tema de la identificación de los componentes activos de los medios tumorales es de interés, sobre todo en lo concerniente a la identificación de componentes, por lo que debe ser abordado de forma específica y mediante tecnología de proteómica.

La siguiente pregunta experimental se desarrolló a partir de la hipótesis que el MC, al igual que ocurre en CE confluentes adheridas, sería capaz de proteger y aumentar la supervivencia de CE desprendidas de la monocapa. Esta posibilidad era relevante desde el punto de vista de la viabilidad en la circulación de las CE desprendidas. Más aún, todo el tema de las CE desarraigadas presenta múltiples lagunas de conocimiento y no se ha abordado de manera sistemática. Simplemente, basta con señalar que se desconoce cuál es la tasa de desprendimiento fisiológico de CE, o cuál es la evolución de las CE circulantes una vez desprendidas. Con este fin, diseñamos un modelo de preconditionamiento de CE, y un sistema de cultivo en suspensión para inducir muerte por desarraigo/anoikis. Con este diseño apuntamos a reproducir lo que ocurriría “in vivo”, cuando las CE reciben estímulos activadores

mientras se encuentran formando parte de la monocapa y posteriormente se desprenden.

Al observar la evolución de la muerte celular en suspensión a lo largo del tiempo, encontramos un incremento de la viabilidad en CE pretratadas con MC de MG63. Este aumento de la viabilidad era similar al obtenido al pretratar con el medio de crecimiento habitual suplementado con SFB. La diferencia con el MF, que incrementaba la muerte celular en suspensión, era notoria. La diferencia de efectos fue aún más marcada cuando se empleó un factor de crecimiento, el VEGF, añadido al MF. A diferencia de lo que ocurre en monocapa, sobre la que el VEGF posee un efecto protector definido, la preincubación con VEGF ejercía una acción deletérea al poner las CE en suspensión. Estos resultados indicaban que la combinación de múltiples factores, presentes tanto en el medio de crecimiento con SFB como en el MC inducía un comportamiento biológico diferente que el empleo de VEGF aislado. El corolario implícito de esta diferencia es que la combinación de factores de los medios complejos, (SFB, MC) posee ventajas cualitativamente diferentes con respecto a la viabilidad de CE en suspensión. La acción negativa del VEGF sugiere que la activación individual de algunas vías supuestamente protectoras provoca un efecto paradójico favorecedor de la anoikis; así, para la prevención de ésta, sería necesaria la combinación de múltiples factores de crecimiento, tal como ocurre con el medio con SFB como en el MC. Sin embargo, la diferencia existente entre las dos curvas inferiores de muerte celular mostradas en la figura 8 sugiere que la presencia de VEGF activo en el MC tumoral añade *per se* un elemento favorecedor de muerte. Lo mismo sucede con las dos curvas superiores de esta misma figura, en este caso referidas al medio de cultivo sin SFB (MF).

El preconditionamiento es una de las herramientas experimentales más efectivas para proteger a la vasculatura frente a una gran variedad de daños (15;101). La gran mayoría de estudios se centran en el preconditionamiento isquémico para proteger a las CE frente a formas de estrés tan diversas como el calor, la propia isquemia, la oxidación o la privación de suero (15;94). Sin embargo, en la mayoría de los estudios se desconoce qué ocurre exactamente en el preconditionamiento, permitiendo a las células ser más viables. Además, hasta el momento, no se habían

publicado resultados de experimentos de preconditionamiento enfocados a proteger frente a muerte por desarraigo. En este sentido, el modelo que empleamos se asemeja a lo que ocurre en la vasculatura normal.

La influencia en la supervivencia endotelial frente a muerte por desarraigo del VEGF presente en el MC se determinó empleando anticuerpos específicos frente a VEGF o frente a su receptor VEGFR2. La reducción de la muerte observada cuando se inhibe al VEGF endógeno que producen las CE mediante un anticuerpo específico avala la implicación del VEGF en la muerte por anoikis sugerida por los experimentos empleando VEGF exógeno.

Un análisis más detallado del papel del VEGF en el fenómeno de anoikis se realizó determinando qué concentración de VEGF era capaz de provocar este efecto favorecedor de la muerte celular por desarraigo. La constatación de que se trataba de un fenómeno dependiente de concentración reafirma la influencia del VEGF, puesto que los efectos comenzaron a observarse al emplear concentraciones equivalentes a las K_d de los receptores de VEGF y se incrementaron al emplear concentraciones superiores.

En una segunda aproximación al papel del VEGF durante la anoikis, nos interesamos por la implicación de los distintos miembros de la familia del VEGF y por la comparación con otros factores de crecimiento. Este estudio permitía discernir la posible implicación de los diferentes receptores del VEGF en el aumento de la sensibilidad a anoikis. Para ello, analizamos comparativamente el efecto de miembros de la familia de VEGF que se unen específicamente al VEGFR1 (PlGF), al VEGFR2 (VEGF-D) o a ambos (VEGF-A). El tratamiento con VEGF-D, que no fue capaz de igualar el efecto deletéreo del VEGF-A, junto con el resultado obtenido al emplear PlGF que, a igual concentración fue mayor que el del VEGF-A, sugiere que existirían diferencias de efecto según el receptor de VEGF implicado. En una interpretación simple de estos resultados, puede afirmarse que el efecto deletéreo del pretratamiento con VEGF sobre las CE en suspensión se vehiculiza a través de sus dos receptores, VEGFR1 y VEGFR2. Si bien parecería existir un posible predominio de VEGFR1, haría falta un análisis más detallado de señalización de cada receptor, especialmente al tener distinta K_d . Como una aportación más al tema de los receptores de VEGF, los datos de la figura 8, a los

que ya nos hemos referido anteriormente en esta discusión, sin embargo favorecen que el papel del receptor VEGFR2 es de máxima importancia. Sin embargo, al tratarse de un tema con interés sólo colateral, no se han realizado más experimentos referidos a receptores, ya que la información obtenida es suficiente a los fines de la interpretación de los hallazgos experimentales. Como dato complementario, recientemente se ha descrito que distintos ligandos pueden producir diferentes patrones de fosforilación en los receptores de VEGF, desencadenando, por tanto, diversos mecanismos de transducción de señal y, finalmente, distintas respuestas biológicas (90).

Por otro lado, la ausencia de efecto del tratamiento con EGF, un factor de crecimiento que actúa a través de otro receptor, fue indicativa de la especificidad del efecto favorecedor de la anoikis del VEGF. La complejidad de la señalización de todos estos receptores hace extremadamente difícil la identificación de las señales, o más precisamente, de las combinaciones de señales involucradas en las acciones de cada uno de estos agentes respecto a la muerte por desarraigo.

Todos estos resultados relativos al efecto deletéreo del pretratamiento con VEGF sobre la muerte por desarraigo eran contrarios a la que sería la hipótesis intuitiva, ya que podía esperarse que el VEGF, como principal molécula protectora del endotelio, fuera capaz de incrementar la supervivencia en suspensión. Con los datos que disponemos, sólo hemos podido identificar como causantes de este tipo de efecto a mediadores que actúan a través de receptores de VEGF. Al no haberse hecho aún un análisis sistemático y exhaustivo de otros factores de crecimiento y citoquinas, sería aventurado afirmar o negar la existencia de especificidad.

Si bien se había descrito que el VEGF no tenía efectos ni protectores ni deletéreos en diversos modelos de muerte por desarraigo o anoikis, en los que se ponía VEGF en el medio de suspensión (40), esta es la primera vez que se describe un efecto del VEGF como inductor de anoikis, al utilizarlo en pretratamiento. En la literatura previa se apunta que añadir VEGF al medio en el que se mantienen las células en suspensión no tiene consecuencias, puesto que la señalización desde los receptores del VEGF depende de una adecuada unión célula-matriz extracelular y célula-célula (71) y se bloquea al producirse el desarraigo (25).

Para intentar discernir los mecanismos implicados en la acción del VEGF, repetimos el pretratamiento con VEGF en presencia de inhibidores específicos de rutas de señalización. Se emplearon inhibidores de las principales rutas de señalización accionadas por VEGF, obteniéndose resultados significativos con inhibidores de la secuencia PI3K/Akt – GSK3 β – β -catenina e inhibidores de JAK2/STAT.

La primera ruta analizada fue la de PI3K/Akt, por su papel central en el mecanismo citoprotector mediado por VEGF. Este experimento se diseñó a partir de la inferencia lógica de que si el VEGF señala hacia protección vía PI3K/Akt, la primera posibilidad a considerar es que la puesta en suspensión de CE “marcadas” para la puesta en marcha de determinados mecanismos, por ejemplo PI3K/Akt, generase una señal letal. Un corolario de este razonamiento sería que la distorsión del sistema de información de la CE al perderse el arraigo desencadena muerte celular, pero que este proceso es más acelerado si primero se ha puesto en marcha una determinada secuencia de señales, aunque se trate de una vía supuestamente citoprotectora.

Así, si bien está sólidamente establecido que la ruta PI3K/Akt se activa por VEGF y que está críticamente implicada en supervivencia endotelial (111), hasta ahora se desconocía la importancia de su inhibición previa en el fenómeno de muerte por desarraigo o anoikis. La reducción de la muerte inducida por VEGF al inhibir esta ruta con LY294002, apoya nuestra hipótesis sobre el efecto paradójico de la activación individual de rutas protectoras. Así, si la activación por parte del VEGF de esta ruta de supervivencia producía un efecto favorecedor de la muerte por desarraigo, la inhibición de ésta la eliminaba del mecanismo y reducía el daño ejercido por el VEGF.

El resultado más llamativo y que nos indicó una dirección definida para el desarrollo de las etapas siguientes de la serie experimental de esta tesis fue el obtenido al emplear AG490, inhibidor específico de JAK2. La capacidad de este inhibidor de proteger a las CE de la muerte por desarraigo, tanto con, como sin preincubación con VEGF, reveló la importancia, previamente desconocida, de esta ruta en el fenómeno de muerte por desarraigo. Este efecto se comprobó al centrarnos en los mecanismos inducidos por el pretratamiento con AG490 y que provocan el incremento de la supervivencia.

En primer lugar, comprobamos la especificidad de este efecto. Diversos autores han descrito que AG490 es capaz de inhibir no sólo JAK2 sino también la quinasa Src (88); sin embargo, el empleo de PP2, inhibidor específico de esta quinasa, no fue capaz de asemejar el comportamiento obtenido al emplear AG490. Este resultado, junto con el obtenido al sobreexpresar la forma deficiente en el dominio quinasa de JAK2, sugiere claramente que el aumento en la supervivencia es un efecto específico de la inhibición de JAK2. Además, el análisis de la fragmentación del ADN confirmó que la muerte observada es por apoptosis, y que este proceso se inhibía al usar AG490. Por lo tanto, puede afirmarse que el fenómeno observado se trata de anoikis, tal y como se ha descrito anteriormente (38).

El siguiente diseño experimental empleado se dirigía a conocer cuanto tiempo se prolonga el efecto protector del pretratamiento con AG490. El ensayo utilizado, la eficacia de resiembra sobre Matrigel, no solo proporcionó un dato cuantitativo (Mayor eficacia en CE tratadas con AG490 y cultivadas en suspensión hasta 48 horas) sino que reveló una consecuencia funcional y de probable proyección práctica. Hasta el momento, no se conocen abordajes farmacológicos capaces de prolongar la vida de CE cultivadas en suspensión y aumentar su eficacia en la resiembra. El empleo de AG490 abre la posibilidad del uso de CE maduras para posibles estrategias de reendotelización. Las ventajas del uso de CE adultas son de aplicación inmediata: a) Menor riesgo de evolución incontrolada respecto al uso de precursores; b) Mayor facilidad de obtención; c) Posibilidad de desarrollo extenso en cultivo (57). Los obstáculos principales para el uso de CE adultas o maduras, vg, su escasa supervivencia y su incapacidad de arraigo, podrían verse sensiblemente atenuados por el tratamiento con AG490 y similares.

A la vista del relevante resultado en la inhibición de la anoikis al bloquear JAK2, nuestros esfuerzos se centraron en discernir qué mecanismos están implicados en este efecto. Los resultados obtenidos mediante Western Blot indicando un incremento de Akt fosforilada demuestra una activación de esta enzima clave de las vías protectoras. Igualmente, el incremento en la cantidad total de Akt puede interpretarse en el mismo sentido de activación. Esta última puede deberse a una disminución de degradación, debido al ya señalado descenso de actividad de caspasas, al tratarse Akt de una de sus

dianas proteolíticas (47). En su conjunto, los hallazgos relacionados con Akt son importantes para entender los mecanismos implicados; el hecho de que Akt se mantenga íntegra y, además, activa, debe favorecer la supervivencia, al igual que se observado en otros estudios en los que se emplea formas constitutivamente activas de Akt y que presentaban pérdida de sensibilidad frente a anoikis (40;61).

Otro resultado de importancia fue la inhibición de GSK3 α/β durante el cultivo en suspensión en CE pretratadas con AG490. Esta inhibición lleva a la estabilización citoplásmica de β -catenina, incrementando así la cantidad de ésta que puede translocarse al núcleo. Este resultado es coherente con lo presentado anteriormente, puesto que GSK3 α/β es sustrato directo de Akt.

Hasta el momento, la participación de un mecanismo implicando GSK3 β - β -catenina en el fenómeno de anoikis se había descrito en tipos celulares distintos del endotelio (120). Sin embargo, se desconocía la importancia de la β -catenina en la supervivencia de CE frente al desarraigo. Los experimentos realizados con inhibidores de GSK3 β , tanto LiCl como SB216763, se emplearon como modelo de aumento de β -catenina funcional. GSK3 β , al fosforilar a β -catenina, la marca para su degradación. Por el contrario, la inhibición de GSK3 β impide fosforilar la β -catenina liberada de las uniones célula-célula, con lo que no se dirige a degradación por el proteasoma y por lo tanto aumenta (84). En estas condiciones de aumento de β -catenina, la reducción de la muerte, tanto en presencia como en ausencia de pretratamiento con VEGF, es patente y sería consecuencia directa de este incremento. Esta posible acción de la β -catenina se confirmó por una metodología más específica, al sobreexpresarla mediante transfección (Figura 14). Ambos experimentos favorecen la importancia de la β -catenina en el fenómeno de muerte por desarraigo en el endotelio.

Este resultado es novedoso y potencialmente aplicable, ya que se trata de la primera vez que se establece que la sobreexpresión de β -catenina (como consecuencia de un aumento de la fosforilación-inactivación de GSK3 β o por sobreexpresión mediante transfección) aumenta la supervivencia endotelial en condiciones de ausencia de uniones celulares. Este hallazgo coincide con lo descrito por diversos autores, que afirman tanto que la inhibición de GSK3 α/β (62) como la sobreexpresión de β -catenina, ya sea experimental por transfección con vectores que la sobreexpresan

(91;120) o por transformación oncogénica (diversas líneas tumorales presentan aumentada la β -catenina) incrementan la supervivencia frente a anoikis. En el caso de estas líneas tumorales, la adquisición de resistencia a anoikis les confiere una gran capacidad invasiva y metastática (121). Nuestros resultados confirman, además, que los cambios observados en la cantidad de β -catenina se deben al pretratamiento con AG490. De un modo más general, los datos presentados, relacionando β -catenina y endotelio, aportan una información nueva en este tipo celular.

La adquisición de un fenotipo resistente a anoikis podría entonces considerarse como paso esencial en la transformación metastática de un tumor. Múltiples estudios indican que la transformación neoplásica desencadena la resistencia a anoikis; la sobreexpresión de oncogenes como ras, raf o rac o la delección de genes supresores de tumores (PTEN, p53) dotaría a las células de propiedades de resistencia a anoikis (22;55;75;79;104). En modelos animales, estos tumores resistentes a anoikis muestran una mayor predisposición a desarrollar lesiones metastásicas y supervivencia en el torrente sanguíneo (86;123). Con los resultados que hemos obtenido, se reafirma la idea de incluir en esta lista a la β -catenina, si bien sería necesario un estudio más pormenorizado, incluyendo un modelo animal como los anteriores, para conocer en mayor profundidad los cambios inducidos al alterar β -catenina.

El significado y posible proyección de la resistencia a anoikis conferida por la inhibición de JAK2 no se puede establecer todavía con precisión. Nuestros resultados revelan un mecanismo y describen un fenómeno, pero sus implicaciones son materia especulativa. Existe un creciente interés y abundante bibliografía, toda ella de los últimos años, acerca de la existencia de un aumento de CE circulantes en situaciones patológicas, como por ejemplo las neoplasias (12). El interés del estudio de este tema tiene, al menos, tres vertientes inmediatas:

- 1) Su uso como prueba diagnóstica, ya que se está analizando el valor del conteo de este tipo de células en el diagnóstico y seguimiento de diversas patologías: Tumores, daño endotelial en fracaso multiorgánico, patología vascular (12;43;64). En nuestro Laboratorio se ha puesto en marcha el estudio de CE adultas circulantes, con la colaboración del Laboratorio de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz. No se tienen datos acerca del estado de viabilidad y

capacidad de resiembra en que se encuentran estas CE circulantes, un tema de gran interés que será necesario abordar.

- 2) El posible papel de las CE circulantes en el proceso de metastatización. No se tienen datos acerca de la composición en CE de metástasis pluricelulares, vg, conteniendo endotelio.
- 3) El posible uso de CE pretratadas para resiembra endotelial en territorios dañados. Esta es la principal aplicación de nuestros resultados, y que puede implicar desarrollos prácticos de utilidad terapéutica.

El estudio de la protección debida a la inhibición de JAK2 frente a la ausencia de suero se realizó no solo para examinar otras capacidades e implicaciones de esta ruta, sino además para obtener información acerca del estado de las CE tras el pretratamiento pero previo al cultivo en suspensión. Por esta razón, nos centramos en la implicación de la β -catenina, cuya importancia durante la anoikis demostramos previamente.

El daño endotelial por ausencia de suero se debe a dos circunstancias principales: en primer lugar, se trata de una autentica deprivación, ya que las células están reprogramadas a un alto estímulo de factores de crecimiento, al ser cultivadas en presencia de concentraciones elevadas de SFB. Por otra parte, se ha comprobado que la retirada del SFB induce un incremento de ROS (72), por mecanismos no bien caracterizados. Este último aspecto es de alta importancia en cuanto al posible papel del AG490 en la interferencia con fenómenos oxidativos.

En primer lugar, si bien el daño causado por cultivar a las CE en ausencia de suero es moderado, es inequívoca la implicación de la ruta JAK2/STAT, en base a la reducción de este daño endotelial al emplear AG490; esta protección es de un nivel similar a la obtenida al emplear la molécula protectora del endotelio por excelencia, el VEGF.

En CE adheridas y sin estimular, la β -catenina se mantiene asociada a la VE-cadherina en las uniones célula-célula; simultáneamente, los niveles citoplásmicos permanecen muy bajos. En nuestro caso, hemos observado cambios tanto en la cantidad como en la distribución de la β -catenina y que están claramente debidos a la inhibición de JAK2 con AG490. Además, la demostración de un aumento en la actividad

transcripcional de β -catenina y de la cantidad de β -catenina funcional en el núcleo nos sugirió que esta proteína tiene un papel muy importante en los efectos protectores; de hecho, el patrón encontrado coincide con el descrito en diversas líneas celulares resistentes a la muerte (54). Por último, debemos indicar que estos cambios en la cantidad, distribución y actividad transcripcional de β -catenina son fenómenos que se describen por primera vez en CE y que asemejan lo obtenido en otros tipos celulares al inhibir GSK3 β con LiCl (62).

En las mismas condiciones en las que hemos observado cambios en la β -catenina, las variaciones en la cantidad de PECAM-1 observadas suponen también un resultado nuevo y de gran proyección potencial, no sólo por el papel de PECAM-1 en sí mismo, sino por su relación con los cambios en la cantidad y distribución de β -catenina. Biswas y cols (14) indican que PECAM-1 está íntimamente asociado con la prevención de la degradación de β -catenina (actuando como reservorio de la β -catenina liberada de las uniones célula-célula) así como con su aumento en el núcleo. Incluso, recientemente se ha visto que PECAM-1 ejerce este efecto mediante inhibición de GSK3 β , encargada de marcar a β -catenina para degradación por el proteasoma (13). En consecuencia, el aumento simultáneo de PECAM-1 y β -catenina observado al inhibir JAK2 con AG490 apoya la existencia de una secuencia operacional para la protección de CE.

En base a la literatura previa, en la que se describe la activación de la ruta JAK2/STAT en casos de estrés oxidativo y la protección frente a éste al inhibir esta ruta en diferentes tipos celulares, astrocitos o músculo liso vascular (45;105), nos centramos en estudiar la implicación de esta ruta en el caso de estrés oxidativo sobre CE.

La alta toxicidad en CE frente a la exposición directa a distintas especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el H₂O₂ o el superóxido, y, sobre todo, la protección observada al inhibir JAK2, ya sea con AG490 o con la forma deficiente en el dominio quinasa, concuerdan con lo descrito para células del músculo liso vascular (105). La activación de la ruta JAK2 en presencia de H₂O₂ desencadena la maquinaria apoptótica, pero su inhibición con AG490 detiene el proceso de daño. En otros tipos celulares, el tratamiento con ROS también desencadena la activación de la ruta

JAK2/STAT (45;108). Aún así, el mecanismo de activación de JAK2 dependiente de ROS está todavía por caracterizar a nivel molecular, si bien se han encontrado datos indicativos de que se debe o a la inactivación temporal y reversible de fosfatasa (36), y probablemente a una activación previa de PKC- δ (37).

Nuestros resultados no se refieren directamente al mecanismo bioquímico de la activación de JAK2 desencadenada por ROS, que queda fuera del objetivo de este estudio, pero, sin embargo, si presentan inequívocamente la implicación de JAK2, ya que el empleo de un inhibidor específico de su fosforilación/activación y de una forma dominante deficiente en el dominio quinasa son capaces de bloquear los efectos desencadenados por la activación de esta ruta por ROS en cuanto a muerte celular.

En esta tesis hemos empleado H_2O_2 y superóxido exógenos como agentes de estrés oxidativo. En cambio, son muchos los casos en los que se produce estrés oxidativo por generación de ROS extra e intracelulares. Uno de estos casos, de extrema importancia clínica, es el trasplante de órganos, donde se produce daño celular por estrés oxidativo tanto en la conservación fría del órgano, como durante la fase de reperfusión (93). Más aún, el empleo de CsA como inmunosupresor en pacientes transplantados también induce daño endotelial por generación de ROS (73).

En nuestro conocimiento, nuestros resultados al emplear el inhibidor específico de JAK2, AG490, en CE tratadas con el medio de conservación de órganos EuroCollins o con CsA son los primeros de su tipo y reafirman el papel de la ruta JAK2/STAT en el estrés oxidativo. Como hemos dicho, tanto la exposición al EuroCollins como a la CsA son básicamente pro-oxidativos. La concordancia entre datos es notable, y puede decirse, en un sentido más general, que la totalidad de las maniobras experimentales inductoras de daño endotelial empleadas en esta tesis y bloqueados al inhibir JAK2, podrían tener como base un mecanismo oxidante.

Añadiendo información a este punto, en una serie de experimentos similares realizados sobre células epiteliales de túbulo proximal de riñón (PTEC), el AG490 también fue capaz de proteger frente al daño oxidativo provocado por H_2O_2 , el medio de conservación de órganos EuroCollins o la CsA, en forma similar a lo observado en CE (Neria y cols, datos sin publicar). La trascendencia de este dato radica en demostrar

que lo reseñado en esta tesis no se limita a efectos endoteliales sino que abarca a otros tipos celulares expuestos a estrés oxidativo.

Se trata de la primera vez que se muestra que el empleo de este inhibidor específico de JAK2 no solo protege del estrés oxidativo cuando se produce la adición exógena de ROS, sino que también lo hace cuando la generación de ROS es endógena, como consecuencia de un tratamiento previo, lo que aporta una serie de proyecciones prácticas directas a estos resultados. Nuevamente, las principales serían el trasplante de riñón y el fracaso renal agudo isquémico, condiciones en las que tanto las CE como las PTEC son diana del daño oxidativo (50;56). Es de interés práctico considerar la posibilidad de realizar estudios experimentales añadiendo al medio de perfusión y conservación de órganos AG490, con objeto de incidir sobre el daño que sufre el riñón durante su conservación fría y trasplante al receptor.

Sobre la base de que el estrés oxidativo desencadena apoptosis, empleamos marcadores apoptóticos estándar, como por ejemplo el ratio Bcl-2/Bax (32;67). Nuestros resultados confirmaron que, efectivamente, la incorporación del estímulo (H_2O_2) promovía una situación proapoptótica con bajo ratio. El retorno a un patrón antiapoptótico al inhibir JAK2 supuso la ratificación de que esta ruta tiene un importante papel en toda la maquinaria disparada por ROS. Además, que esta modificación en el ratio Bcl-2/Bax sea principalmente causada por cambios en la cantidad de Bcl-2 (incrementada en CE tratadas con AG490) supone una reafirmación de nuestros hallazgos sobre protección frente a ROS al inhibir JAK2, ya que en la literatura existen multitud de evidencias donde se relaciona a Bcl-2 con protección de las células frente a una gran cantidad de estímulos que inducen apoptosis, como privación de factores de crecimiento o drogas que dañan al ADN (124). Esta habilidad puede estar relacionada con las propiedades antioxidantes de Bcl-2 (28). Por tanto, un incremento en el ratio Bcl-2/Bax puede determinar la supervivencia celular tras un estímulo apoptótico (65).

Los estudios acerca de la actividad de la caspasa 3 refuerzan los hallazgos observados sobre la inhibición de la muerte apoptótica inducida por ROS por el tratamiento con AG490. Este resultado y los obtenidos sobre el ratio Bcl-2/Bax nos permitieron afirmar que, efectivamente, se trataba de un fenómeno de apoptosis

inducida por ROS, en el que la ruta JAK2/STAT tuvo un papel crucial. Ambos resultados (incremento del ratio Bcl-2/Bax e inhibición de la actividad de la caspasa 3) confirmaron los hallazgos obtenidos en otros tipos celulares (45;105); así, en células del músculo liso vascular, el estímulo oxidativo (H_2O_2) provoca un incremento de Bax, que se ve reducido al inhibir JAK2 (105). Sin embargo, el último hallazgo presentado en esta tesis introdujo un nuevo interrogante: ¿cuál es el efecto principal del AG490 en condiciones pro-oxidantes? Los micrografías que muestran que la oxidación/fluorescencia de la rodamina es prácticamente ausente en CE pretratadas con AG490 pondrían de manifiesto que, si bien el AG490 es capaz de bloquear los mecanismos inducidos por el estrés oxidativo, también actuaría o bien como un antioxidante o como activador de mecanismos antioxidantes. La probabilidad de que se trate de un antioxidante o “scavenger” de ROS por sí mismo quedaría razonablemente descartada *a priori*, en base a la estructura química del AG490, que no sugiere una capacidad aceptora de protones (42). Los resultados obtenidos tanto de citotoxicidad y, sobre todo, de la fluorescencia de la rodamina en CE transfectadas con la forma deficiente en el dominio quinasa de JAK2 descartan, aun más si cabe, la posible naturaleza “scavenger” del AG490 y desvelan la importancia de la inhibición de JAK2 en el bloqueo del daño oxidativo. Sin embargo, es necesario un estudio más pormenorizado y dirigido para determinar si, efectivamente, AG490 es capaz de activar los mecanismos antioxidantes propios de las CE. De todos modos, este resultado apoya nuevamente el posible empleo de AG490 durante la conservación de órganos, dada su extraordinaria capacidad de reducir la actividad de ROS.

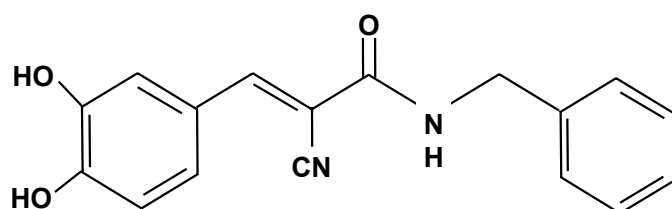


FIGURA 25: Estructura química del AG490

Los estudios de esta tesis en cuanto a mecanismos finalizan con un interrogante sin resolver, vg, cual es el paso siguiente, y probablemente final, por el que la preincubación con VEGF y AG490 inducen efectos diametralmente opuestos.

Una explicación simple, pero que merece ser estudiada, es la posibilidad de que la activación de STAT3, tal como la ejercida por VEGF o ROS, tenga un papel importante en la puesta en marcha de vías letales. Por el contrario, hemos comprobado muy recientemente (Neria y cols, datos sin publicar) que la activación de otra STAT, STAT5, tiene efectos protectores. En conjunto, estos datos sugieren que las STATs serían el elemento decisivo en la decisión celular hacia la protección o el daño.

Los estudios *in vivo* confirmaron, finalmente, lo que mostraron los experimentos sobre cultivos de CE. Los hallazgos acerca de los capilares peritubulares ratifican lo observado por Kang y cols (59), que muestran un mayor daño de estos vasos sin afectar al glomérulo en condiciones de toxicidad por anticalcineurínicos (66) y en otras entidades. El incremento de la tinción con lectina al tratar con CsA (empleado como inductor de daño oxidativo) es indicativo de mayor daño de los capilares, tal como han demostrado previamente otros grupos, aunque empleando distintos modelos de daño (24;81). Como comentario metodológico, en el presente trabajo, es la primera vez que se describe el incremento de unión de lectina tras exposición a CsA. En todos estos casos, los ligandos de superficie de las CE sometidas al daño quedan más expuestos, permitiendo un incremento del reconocimiento de la lectina sobre sus sitios de unión (24). El resultado obtenido al inhibir JAK2 con AG490 en presencia de CsA en este modelo *in vivo* es relevante en términos de protección frente al daño microcirculatorio en trasplantes de riñón y en otros casos de toxicidad por CsA y agentes con efectos similares. De hecho, al ser la lesión de estos capilares crítica en el desarrollo del daño por CsA (59;69), tanto agudo como crónico, el AG490 podría emplearse para reducir esta toxicidad. Más aún, son extremadamente escasos los medios de tratamiento disponibles para prevenir el daño capilar peritubular.

Por tanto, el conjunto de resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* nos permiten sugerir el empleo de inhibidores de JAK2 (como el AG490) tanto en la conservación del riñón anterior al trasplante como en la posterior administración de CsA, con un único objetivo: evitar el daño de las CE por el estrés oxidativo a la que se ven sometidas durante todo este proceso.

Además, el posible efecto antioxidante o activador de mecanismos antioxidantes de la inhibición de JAK2 es coherente con los resultados obtenidos al

emplear AG490 en pretratamiento antes de inducir anoikis. Li y cols indicaban que se producía una disminución de la anoikis al emplear antioxidantes sobre CE (70). Si AG490 tiene esta capacidad, añadiría un componente más a los mecanismos protectores frente a anoikis descritos en esta tesis, eg, mayor β -catenina, aumento de Akt y Akt activa, todos ellos inducidos al inhibir JAK2.

En conjunto, nuestros resultados principales sugieren una interpretación de los efectos de JAK2 y su inhibición, que será necesario estudiar en mayor profundidad. Esta vía está todavía en las primeras etapas de su caracterización y queda aún un campo muy amplio sin dilucidar. Así, la acción de agentes estimuladores de JAK2 previa al desarraigo es definidamente perjudicial para la viabilidad celular y lo opuesto se observa con la inhibición de JAK2. Los datos obtenidos en esta tesis favorecen que, al menos en parte, la protección conferida por AG490/dominante negativo de JAK2 se relaciona con un papel deletéreo de esta vía en relación a oxidación celular. Estos datos son compatibles con resultados recientes del Laboratorio (44) que demuestran como una exposición oxidante leve tiene efectos citoprotectores y pre-condicionantes, que desaparecen en presencia de estímulos oxidativos más intensos. Esta dualidad de acciones coincide con los también duales efectos de la estimulación y bloqueo de JAK2 referidos en la literatura.

CONCLUSIONES

1. Los mecanismos implicados en la protección endotelial inducidos por el MC de la línea tumoral MG63 en CE confluentes incluyen la activación de rutas de supervivencia endotelial (PI3K/Akt y MAPK) y la inhibición de la caspasa 3.
2. El pretratamiento de CE con MC tumoral o con medio de cultivo con SFB aumenta la supervivencia endotelial cuando se desprenden de la monocapa.
3. Al contrario de lo esperado, el pretratamiento de CE con VEGF induce un incremento de la muerte celular cuando se produce el desarraigo. Este efecto es exclusivo de VEGF y PlGF, dependiente de VEGFR1 y VEGFR2, y con participación significativa de la ruta PI3K/Akt.
4. La inhibición de la ruta JAK2/STAT durante el pretratamiento protege a las CE de la muerte por anoikis y aumenta su capacidad de crecimiento en resiembra. Los mecanismos implicados en esta protección incluyen al eje PI3K/Akt-GSK3 β - β -catenina.
5. El incremento de la β -catenina funcional protege a las CE de la muerte por desarraigo. Esta protección está mediada por cambios en la cantidad, distribución y actividad transcripcional de β -catenina, así como por un aumento de PECAM-1.
6. La inhibición de JAK2 también protege a las CE frente a la exposición a ROS, ya sea directa (H₂O₂ o superóxido) o indirecta (EuroCollins, CsA). Los mecanismos implicados en esta protección comprenden tanto el aumento en el ratio Bcl-2/Bax como la inhibición de la caspasa 3. El efecto protector de la inhibición de JAK2 está relacionado con una disminución de la oxidación celular.
7. El efecto protector del AG490 se manifiesta también *in vivo*, inhibiendo el daño inducido por un agente con capacidad oxidativa, la ciclosporina A, sobre las CE de los capilares peritubulares renales de ratón.
8. Como corolario general, el comportamiento respecto al VEGF y moléculas similares de las CE adheridas y en monocapa difiere sustancialmente del observado en las células en suspensión. A diferencia de lo encontrado en estudios miocárdicos, la inhibición de JAK2 es definitivamente protectora de las CE.

9. A efectos prácticos, la inhibición de JAK2 reduce el daño producido por diferentes formas de agresión oxidativa sobre el endotelio. Este hallazgo puede aplicarse potencialmente a diferentes situaciones patológicas, desde la isquemia-reperfusión, el trasplante o el daño tóxico.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Aaronson DS y Horvath CM.** A road map for those who don't know JAK-STAT. *Science* 296: 1653-1655, 2002.

2. **Achen MG, Williams RA, Minekus MP, Thornton GE, Stenvers K, Rogers PA, Lederman F, Roufail S, y Stacker SA.** Localization of vascular endothelial growth factor-D in malignant melanoma suggests a role in tumour angiogenesis. *J Pathol* 193: 147-154, 2001.

3. **Akeno N, Czyzyk-Krzeska MF, Gross TS, y Clemens TL.** Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene transcription in human osteoblast-like cells through the hypoxia-inducible factor-2alpha. *Endocrinology* 142: 959-962, 2001.

4. **Almeida EA, Ilic D, Han Q, Hauck CR, Jin F, Kawakatsu H, Schlaepfer DD, y Damsky CH.** Matrix survival signaling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Cell Biol* 149: 741-754, 2000.

5. **Alvarez Arroyo MV, Suzuki Y, Yague S, Lorz C, Jimenez S, Soto C, Barat A, Belda E, Gonzalez-Pacheco FR, Deudero JJ, Castilla MA, Egido J, Ortiz A, y Caramelo C.** Role of endogenous vascular endothelial growth factor in tubular cell protection against acute cyclosporine toxicity. *Transplantation* 74: 1618-1624, 2002.

6. **Attwell S, Roskelley C, y Dedhar S.** The integrin-linked kinase (ILK) suppresses anoikis. *Oncogene* 19: 3811-3815, 2000.

7. **Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, Kroll J, Plaisance S, De Mol M, Bono F, Kliche S, Fellbrich G, Ballmer-Hofer K, Maglione D, Mayr-Beyrle U, Dewerchin M, Dombrowski S, Stanimirovic D, Van Hummelen P, Dehio C, Hicklin DJ, Persico G, Herbert JM, Communi D, Shibuya M, Collen D, Conway EM, y Carmeliet P.** Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med* 9: 936-943, 2003.

8. Bachelder RE, Wendt MA, Fujita N, Tsuruo T, y Mercurio AM. The cleavage of Akt/protein kinase B by death receptor signaling is an important event in detachment-induced apoptosis. *J Biol Chem* 276: 34702–34707, 2001.
9. Bartoli M, Gu X, Tsai NT, Venema RC, Brooks SE, Marrero MB, y Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor activates STAT proteins in aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 275: 33189–33192, 2000.
10. Bazzoni G y Dejana E. Pores in the sieve and channels in the wall: control of paracellular permeability by junctional proteins in endothelial cells. *Microcirculation* 8: 143–152, 2001.
11. Bergin E, Levine JS, Koh JS, y Lieberthal W. Mouse proximal tubular cell-cell adhesion inhibits apoptosis by a cadherin-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F758–F768, 2000.
12. Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, y Kerbel RS. The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer* 6: 835–845, 2006.
13. Biswas P, Canosa S, Schoenfeld D, Schoenfeld J, Li P, Cheas LC, Zhang J, Cordova A, Sumpio B, y Madri JA. PECAM-1 affects GSK-3 β -mediated β -catenin phosphorylation and degradation. *Am J Pathol* 169: 314–324, 2006.
14. Biswas P, Canosa S, Schoenfeld J, Schoenfeld D, Tucker A, y Madri JA. PECAM-1 promotes β -catenin accumulation and stimulates endothelial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 212–218, 2003.
15. Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 87: 972–983, 2000.
16. Byzova TV, Goldman CK, Jankau J, Chen J, Cabrera G, Achen MG, Stacker SA, Carnevale KA, Siemionow M, Deitcher SR, y DiCorleto PE. Adenovirus encoding vascular

endothelial growth factor-D induces tissue-specific vascular patterns in vivo. *Blood* 99: 4434-4442, 2002.

17. Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, Zanetti A, Angellilo A, Mattot V, Nuyens D, Lutgens E, Clotman F, de Ruiter MC, Gittenberger-de Groot A, Poelmann R, Lupu F, Herbert JM, Collen D, y Dejana E. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell* 98: 147-157, 1999.

18. Castilla MA, Arroyo MV, Aceituno E, Aragoncillo P, Gonzalez-Pacheco FR, Texeiro E, Bragado R, y Caramelo C. Disruption of cadherin-related junctions triggers autocrine expression of vascular endothelial growth factor in bovine aortic endothelial cells : effects on cell proliferation and death resistance. *Circ Res* 85: 1132-1138, 1999.

19. Castilla MA, Neria F, Renedo G, Pereira DS, Gonzalez-Pacheco FR, Jimenez S, Tramon P, Deudero JJ, Arroyo MV, Yague S, y Caramelo C. Tumor-induced endothelial cell activation: role of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1170-C1176, 2004.

20. Cetkovic-Cvrlje M y Uckun FM. Targeting Janus kinase 3 in the treatment of leukemia and inflammatory diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 52: 69-82, 2004.

21. Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, y Ben Ze'ev A. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest* 109: 987-991, 2002.

22. Coniglio SJ, Jou TS, y Symons M. Rac1 protects epithelial cells against anoikis. *J Biol Chem* 276: 28113-28120, 2001.

23. Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, y Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 28: 488-494, 2003.

24. de Vries B, Walter SJ, Peutz-Kootstra CJ, Wolfs TG, van Heurn LW, y Buurman WA. The mannose-binding lectin-pathway is involved in complement activation in the course of renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 165: 1677–1688, 2004.
25. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 261–270, 2004.
26. Dejana E, Bazzoni G, y Lampugnani MG. Vascular endothelial (VE)-cadherin: only an intercellular glue? *Exp Cell Res* 252: 13–19, 1999.
27. Dejana E, Spagnuolo R, y Bazzoni G. Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. *Thromb Haemost* 86: 308–315, 2001.
28. Deng X, Gao F, y May WS, Jr. Bcl2 retards G1/S cell cycle transition by regulating intracellular ROS. *Blood* 102: 3179–3185, 2003.
29. Dhalla NS, Temsah RM, y Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18: 655–673, 2000.
30. Diaz-Montero CM y McIntyre BW. Acquisition of anoikis resistance in human osteosarcoma cells. *Eur J Cancer* 39: 2395–2402, 2003.
31. El Adawi H, Deng L, Tramontano A, Smith S, Mascareno E, Ganguly K, Castillo R, y El Sherif N. The functional role of the JAK-STAT pathway in post-infarction remodeling. *Cardiovasc Res* 57: 129–138, 2003.
32. Engel RH y Evens AM. Oxidative stress and apoptosis: a new treatment paradigm in cancer. *Front Biosci* 11: 300–312, 2006.
33. Espada J, Peinado H, Esteller M, y Cano A. Direct metabolic regulation of beta-catenin activity by the p85alpha regulatory subunit of phosphoinositide 3-OH kinase. *Exp Cell Res* 305: 409–417, 2005.

34. Ferrara N. The role of VEGF in the regulation of physiological and pathological angiogenesis. *EXS* 209–231, 2005.
35. Ferrara N, Gerber HP, y LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669–676, 2003.
36. Finkel T y Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239–247, 2000.
37. Frank GD, Mifune M, Inagami T, Ohba M, Sasaki T, Higashiyama S, Dempsey PJ, y Eguchi S. Distinct mechanisms of receptor and nonreceptor tyrosine kinase activation by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: role of metalloprotease and protein kinase C- δ . *Mol Cell Biol* 23: 1581–1589, 2003.
38. Frisch SM y Francis H. Disruption of epithelial cell–matrix interactions induces apoptosis. *J Cell Biol* 124: 619–626, 1994.
39. Frisch SM, Vuori K, Ruoslahti E, y Chan–Hui PY. Control of adhesion–dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J Cell Biol* 134: 793–799, 1996.
40. Fujio Y y Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage–dependent manner. *J Biol Chem* 274: 16349–16354, 1999.
41. Gao C, Sun W, Christofidou–Solomidou M, Sawada M, Newman DK, Bergom C, Albelda SM, Matsuyama S, y Newman PJ. PECAM–1 functions as a specific and potent inhibitor of mitochondrial–dependent apoptosis. *Blood* 102: 169–179, 2003.
42. Gazit A, Yaish P, Gilon C, y Levitzki A. Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors. *J Med Chem* 32: 2344–2352, 1989.

43. George J, Shmilovich H, Deutsch V, Miller H, Keren G, y Roth A. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells. *Tissue Eng* 12: 331–335, 2006.

44. Gonzalez–Pacheco FR, Deudero JJ, Castellanos MC, Castilla MA, Alvarez–Arroyo MV, Yague S, y Caramelo C. Mechanisms of endothelial response to oxidative aggression: protective role of autologous VEGF and induction of VEGFR2 by H₂O₂. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H1395–H1401, 2006.

45. Gorina R, Petegnief V, Chamorro A, y Planas AM. AG490 prevents cell death after exposure of rat astrocytes to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines: involvement of the Jak2/STAT pathway. *J Neurochem* 92: 505–518, 2005.

46. Gradl D, Kuhl M, y Wedlich D. The Wnt/Wg signal transducer beta–catenin controls fibronectin expression. *Mol Cell Biol* 19: 5576–5587, 1999.

47. Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment–induced apoptosis--Anoikis". *Apoptosis* 7: 247–260, 2002.

48. Grossmann J, Artinger M, Grasso AW, Kung HJ, Scholmerich J, Fiocchi C, y Levine AD. Hierarchical cleavage of focal adhesion kinase by caspases alters signal transduction during apoptosis of intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 120: 79–88, 2001.

49. Grossmann J, Walther K, Artinger M, Rummele P, Woenckhaus M, y Scholmerich J. Induction of apoptosis before shedding of human intestinal epithelial cells. *Am J Gastroenterol* 97: 1421–1428, 2002.

50. Hall AV y Jevnikar AM. Significance of endothelial cell survival programs for renal transplantation. *Am J Kidney Dis* 41: 1140–1154, 2003.

51. Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi J, Iwanaga K, Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Yamauchi-Takahara K, y Komuro I. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 11: 305–311, 2005.
52. Hattori R, Maulik N, Otani H, Zhu L, Cordis G, Engelman RM, Siddiqui MA, y Das DK. Role of STAT3 in ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1929–1936, 2001.
53. Hehlhans S, Haase M, y Cordes N. Signalling via integrins: implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim Biophys Acta* 1775: 163–180, 2007.
54. Ilan N, Tucker A, y Madri JA. Vascular endothelial growth factor expression, beta-catenin tyrosine phosphorylation, and endothelial proliferative behavior: a pathway for transformation? *Lab Invest* 83: 1105–1115, 2003.
55. Ilic D, Almeida EA, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S, y Damsky CH. Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J Cell Biol* 143: 547–560, 1998.
56. Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 87: 179–183, 2000.
57. Iwaguro H y Asahara T. Endothelial progenitor cell culture and gene transfer. *Methods Mol Med* 112: 239–247, 2005.
58. Jacobi J, Kristal B, Chezar J, Shaul SM, y Sela S. Exogenous superoxide mediates pro-oxidative, proinflammatory, and procoagulatory changes in primary endothelial cell cultures. *Free Radic Biol Med* 39: 1238–1248, 2005.

59. Kang DH, Kim YG, Andoh TF, Gordon KL, Suga S, Mazzali M, Jefferson JA, Hughes J, Bennett W, Schreiner GF, y Johnson RJ. Post-cyclosporine-mediated hypertension and nephropathy: amelioration by vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol* 280: F727–F736, 2001.
60. Khwaja A y Downward J. Lack of correlation between activation of Jun-NH2-terminal kinase and induction of apoptosis after detachment of epithelial cells. *J Cell Biol* 139: 1017–1023, 1997.
61. Khwaja A, Rodriguez-Viciana P, Wennstrom S, Warne PH, y Downward J. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J* 16: 2783–2793, 1997.
62. Kim HS, Skurk C, Thomas SR, Bialik A, Suhara T, Kureishi Y, Birnbaum M, Keaney JF, Jr., y Walsh K. Regulation of angiogenesis by glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem* 277: 41888–41896, 2002.
63. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, y Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285: 1–24, 2002.
64. Koc M, Richards HB, Bihorac A, Ross EA, Schold JD, y Segal MS. Circulating endothelial cells are associated with future vascular events in hemodialysis patients. *Kidney Int* 67: 1078–1083, 2005.
65. Kutuk O y Basaga H. Bcl-2 protein family: implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. *Apoptosis* 11: 1661–1675, 2006.
66. Lamas S. Cellular mechanisms of vascular injury mediated by calcineurin inhibitors. *Kidney Int* 68: 898–907, 2005.
67. Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S, y Brenner C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol* 20: 205–219, 2005.

68. Le Gall M, Chambard JC, Breittmayer JP, Grall D, Pouyssegur J, y Obberghen-Schilling E. The p42/p44 MAP kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal. *Mol Biol Cell* 11: 1103–1112, 2000.
69. Lee SY, Jo SK, Cho WY, Kim HK, y Won NH. The effect of alpha-melanocyte-stimulating hormone on renal tubular cell apoptosis and tubulointerstitial fibrosis in cyclosporine A nephrotoxicity. *Transplantation* 78: 1756–1764, 2004.
70. Li AE, Ito H, Rovira II, Kim KS, Takeda K, Yu ZY, Ferrans VJ, y Finkel T. A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis. *Circ Res* 85: 304–310, 1999.
71. Liu W, Ahmad SA, Reinmuth N, Shaheen RM, Jung YD, Fan F, y Ellis LM. Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis* 5: 323–328, 2000.
72. Lopes NH, Vasudevan SS, Gregg D, Selvakumar B, Pagano PJ, Kovacic H, y Goldschmidt-Clermont PJ. Rac-dependent monocyte chemoattractant protein-1 production is induced by nutrient deprivation. *Circ Res* 91: 798–805, 2002.
73. Lopez-Ongil S, Hernandez-Perera O, Navarro-Antolin J, Perez dL, Rodriguez-Puyol M, Lamas S, y Rodriguez-Puyol D. Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol* 124: 447–454, 1998.
74. Lum H y Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C719–C741, 2001.
75. Maehama T, Taylor GS, y Dixon JE. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu Rev Biochem* 70: 247–279, 2001.
76. Mao CD, Hoang P, y DiCorleto PE. Lithium inhibits cell cycle progression and induces stabilization of p53 in bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 276: 26180–26188, 2001.

77. Mascareno E, El Shafei M, Maulik N, Sato M, Guo Y, Das DK, y Siddiqui MA. JAK/STAT signaling is associated with cardiac dysfunction during ischemia and reperfusion. *Circulation* 104: 325–329, 2001.

78. Maziere C, Conte MA, y Maziere JC. Activation of JAK2 by the oxidative stress generated with oxidized low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* 31: 1334–1340, 2001.

79. McFall A, Ulku A, Lambert QT, Kusa A, Rogers–Graham K, y Der CJ. Oncogenic Ras blocks anoikis by activation of a novel effector pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 21: 5488–5499, 2001.

80. Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, y Roifman CM. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 379: 645–648, 1996.

81. Moller–Kristensen M, Wang W, Ruseva M, Thiel S, Nielsen S, Takahashi K, Shi L, Ezekowitz A, Jensenius JC, y Gadjeva M. Mannan-binding lectin recognizes structures on ischaemic reperfused mouse kidneys and is implicated in tissue injury. *Scand J Immunol* 61: 426–434, 2005.

82. Monton M, Castilla MA, Alvarez Arroyo MV, Tan D, Gonzalez–Pacheco FR, Lopez FA, Casado S, y Caramelo C. Effects of angiotensin II on endothelial cell growth: role of AT-1 and AT-2 receptors. *J Am Soc Nephrol* 9: 969–974, 1998.

83. Munoz–Chapuli R, Quesada AR, y Angel MM. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 61: 2224–2243, 2004.

84. Nelson WJ y Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303: 1483–1487, 2004.

85. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, y Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271–279, 1991.
86. Nikiforov MA, Hagen K, Ossovskaya VS, Connor TM, Lowe SW, Deichman GI, y Gudkov AV. p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis. *Oncogene* 13: 1709–1719, 1996.
87. Nor JE, Christensen J, Mooney DJ, y Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)–mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl–2 expression. *Am J Pathol* 154: 375–384, 1999.
88. Oda Y, Renaux B, Bjorge J, Saifeddine M, Fujita DJ, y Hollenberg MD. cSrc is a major cytosolic tyrosine kinase in vascular tissue. *Can J Physiol Pharmacol* 77: 606–617, 1999.
89. Olmeda D, Castel S, Vilaro S, y Cano A. Beta–catenin regulation during the cell cycle: implications in G2/M and apoptosis. *Mol Biol Cell* 14: 2844–2860, 2003.
90. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, y Claesson–Welsh L. VEGF receptor signalling – in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 359–371, 2006.
91. Orford K, Orford CC, y Byers SW. Exogenous expression of beta–catenin regulates contact inhibition, anchorage–independent growth, anoikis, and radiation–induced cell cycle arrest. *J Cell Biol* 146: 855–868, 1999.
92. Otani H. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in ischemic preconditioning. *Antioxid Redox Signal* 6: 449–469, 2004.
93. Peters SM, Rauen U, Tijssen MJ, Bindels RJ, van Os CH, de Groot H, y Wetzels JF. Cold preservation of isolated rabbit proximal tubules induces radical–mediated cell injury. *Transplantation* 65: 625–632, 1998.

94. Pohlman TH y Harlan JM. Adaptive responses of the endothelium to stress. *J Surg Res* 89: 85–119, 2000.
95. Pugh CW y Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9: 677–684, 2003.
96. Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, y Kerbel RS. Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 55: 4575–4580, 1995.
97. Rawlings JS, Rosler KM, y Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117: 1281–1283, 2004.
98. Romer LH, Birukov KG, y Garcia JG. Focal adhesions: paradigm for a signaling nexus. *Circ Res* 98: 606–616, 2006.
99. Rosen K, Coll ML, Li A, y Filmus J. Transforming growth factor- α prevents detachment-induced inhibition of c-Src kinase activity, Bcl-XL down-regulation, and apoptosis of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 276: 37273–37279, 2001.
100. Royall JA y Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 302: 348–355, 1993.
101. Rubino A y Yellon DM. Ischaemic preconditioning of the vasculature: an overlooked phenomenon for protecting the heart? *Trends Pharmacol Sci* 21: 225–230, 2000.
102. Ruegg C, Dormond O, y Mariotti A. Endothelial cell integrins and COX-2: mediators and therapeutic targets of tumor angiogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1654: 51–67, 2004.

103. Ruegg C y Mariotti A. Vascular integrins: pleiotropic adhesion and signaling molecules in vascular homeostasis and angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* 60: 1135–1157, 2003.

104. Rytomaa M, Lehmann K, y Downward J. Matrix detachment induces caspase-dependent cytochrome c release from mitochondria: inhibition by PKB/Akt but not Raf signalling. *Oncogene* 19: 4461–4468, 2000.

105. Sandberg EM y Sayeski PP. Jak2 tyrosine kinase mediates oxidative stress-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 279: 34547–34552, 2004.

106. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, y Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 17: 6419, 1989.

107. Siemeister G, Weindel K, Mohrs K, Barleon B, Martiny-Baron G, y Marme D. Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res* 56: 2299–2301, 1996.

108. Simon AR, Rai U, Fanburg BL, y Cochran BH. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Am J Physiol* 275: C1640–C1652, 1998.

109. Sivan-Loukianova E, Awad OA, Stepanovic V, Bickenbach J, y Schattelman GC. CD34+ blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *J Vasc Res* 40: 368–377, 2003.

110. Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, y Bussolino F. Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO J* 18: 882–892, 1999.

111. Song G, Ouyang G, y Bao S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9: 59–71, 2005.
112. Steinhilber U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, y Huber O. Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis. *J Biol Chem* 276: 4972–4980, 2001.
113. Swan EA, Jasser SA, Holsinger FC, Doan D, Bucana C, y Myers JN. Acquisition of anoikis resistance is a critical step in the progression of oral tongue cancer. *Oral Oncol* 39: 648–655, 2003.
114. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, y Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 65: 550–563, 2005.
115. Tetsu O y McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398: 422–426, 1999.
116. Tommasini I, Sestili P, y Cantoni O. Delayed formation of hydrogen peroxide mediates the lethal response evoked by peroxynitrite in U937 cells. *Mol Pharmacol* 61: 870–878, 2002.
117. Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44: 248–252, 2004.
118. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, y Kerbel RS. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 264: 781–788, 1999.
119. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, y Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44–84, 2007.

120. Weng Z, Xin M, Pablo L, Grueneberg D, Hagel M, Bain G, Muller T, y Papkoff J. Protection against anoikis and down-regulation of cadherin expression by a regulatable beta-catenin protein. *J Biol Chem* 277: 18677–18686, 2002.
121. Yang F, Zeng Q, Yu G, Li S, y Wang CY. Wnt/beta-catenin signaling inhibits death receptor-mediated apoptosis and promotes invasive growth of HNSCC. *Cell Signal* 18: 679–687, 2006.
122. Zachary I. Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 280: C1375–C1386, 2001.
123. Zhu Z, Sanchez-Sweatman O, Huang X, Wiltout R, Khokha R, Zhao Q, y Gorelik E. Anoikis and metastatic potential of cloudman S91 melanoma cells. *Cancer Res* 61: 1707–1716, 2001.
124. Zinkel S, Gross A, y Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. *Cell Death Differ* 13: 1351–1359, 2006.

ANEXOS

Artículos que forman parte de esta Tesis:

TUMOR-INDUCED ENDOTHELIAL CELL ACTIVATION: ROLE OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR. M. Ángeles Castilla, **Fernando Neria**, Guadalupe Renedo, Daniel S. Pereira, Francisco R. González-Pacheco, Sonsoles Jiménez, Paloma Tramón, J. J. P. Deudero M. V. Alvarez Arroyo, Susana Yagüe, Carlos Caramelo. *American Journal of Physiology: Cell Physiology* 286, C1170–C1176, 2004.

EFFECTOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF) Y DE MEDIOS TUMORALES EN LA ACTIVACIÓN Y SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS ENDOTELIALES. **F Neria**, C Caramelo, FR González-Pacheco, JJ Deudero, MA Castilla. *Investigación Cardiovascular* 9 (2), 130–147, 2006.

MECHANISMS OF ENDOTHELIAL CELL PROTECTION BY BLOCKADE OF THE JAK2/STAT PATHWAY: INHIBITION OF THE ANOIKIS PHENOMENON. **F Neria**, C Caramelo, H Peinado, FR González-Pacheco, JJ Deudero, AJ de Solís, R Fernández-Sánchez, S Peñate, A Cano, MA Castilla. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*. 292, C1123–C1131, 2007.

JAK2 INHIBITION PROTECTS ENDOTHELIAL AND TUBULAR EPITHELIAL CELLS AGAINST OXIDATIVE INJURY: *IN VITRO* AND *IN VIVO* EVIDENCE. **F Neria**, MA Castilla, R. Fernández-Sánchez, FR González-Pacheco, JJ Deudero, S Peñate, A Tejedor, F Manzarbeitia, C Caramelo. *American Journal of Transplantation*. En revisión

Otros artículos publicados no relacionados con esta Tesis:

PAPEL DEL VEGF EN LA RESPUESTA CELULAR A LA AGRESIÓN. Alvarez Arroyo MV, Yagüe S, González-Pacheco FR, Castilla MA, Suzuki Y, Jiménez S, Deudero JJP, **Neria F**, Velasco L, Caramelo C. *Nefrología* XXIII, 54–57, 2003.

RESPUESTA RETICULOCITARIA TRAS CESE INMEDIATO DE ADMINISTRACIÓN DE ERITROPOYETINA RECOMBINANTE HUMANA EN ENFERMOS EN HEMODIÁLISIS CRÓNICA. IMPLICACIONES EN LA TERAPIA DE LA ANEMIA. C. Caramelo, C. Soto, **F. Neria**, M. D. López, S. Jiménez, M. Albalade, R. de Oña, P. Llamas, J. J. P. Deudero. *Nefrología* XXIV, 351–356, 2004.

PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF) EN LA PROTECCIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES. F. R. González-Pacheco, M. A. Castilla, M. V. Álvarez-Arroyo, J. J. P. Deudero, **F. Neria**, A. J. de Solís, S. Yagüe, C. Caramelo. *Nefrología* XXIV, Número Extraordinario (I), 6–7, 2004

ASPECTOS ACTUALES DE LA RESPUESTA A LA HIPOXIA: CONTROL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA. C Caramelo, JJ Deudero, MA Castilla, S Justo, AJ de Solís, **F Neria**, S Peñate, FR González-Pacheco. *Medicina (B Aires)* 66, 155–164, 2006.

Tumor-induced endothelial cell activation: role of vascular endothelial growth factor

M. Ángeles Castilla,^{1,2} Fernando Neria,^{1,2} Guadalupe Renedo,¹ Daniel S. Pereira,³ Francisco R. González-Pacheco,^{1,2} Sonsoles Jiménez,¹ Paloma Tramón,¹ J. J. P. Deudero,¹ M. V. Alvarez Arroyo,^{1,2} Susana Yagüe,^{1,2} and Carlos Caramelo^{1,2,4}

¹Instituto de Investigaciones Médicas, Fundación Jiménez Díaz; ²Universidad Autónoma de Madrid, and ³Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica, 28040 Madrid, Spain; and ⁴Molecular and Cell Biology Department, Imclone Systems Incorporated, New York, New York 10014

Submitted 17 July 2003; accepted in final form 23 December 2003

Castilla, M. Ángeles, Fernando Neria, Guadalupe Renedo, Daniel S. Pereira, Francisco R. González-Pacheco, Sonsoles Jiménez, Paloma Tramón, J. J. P. Deudero, M. V. Alvarez Arroyo, Susana Yagüe, and Carlos Caramelo. Tumor-induced endothelial cell activation: role of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1170–C1176, 2004. First published January 7, 2004; 10.1152/ajpcell.00306.2003.—Proangiogenic, proliferative effects of tumors have been extensively characterized in subconfluent endothelial cells (EC), but results in confluent, contact-inhibited EC are critically lacking. The present study examined the effect of tumor-conditioned medium (CM) of the malignant osteoblastic cell line MG63 on monolayer, quiescent bovine aorta EC. MG63-CM and MG63-CM + CoCl₂ significantly increased EC survival in serum-starved conditions, without inducing EC proliferation. Furthermore, MG63-CM and MG63-CM + CoCl₂, both containing high amounts of vascular endothelial growth factor (VEGF), induced relevant phenotypic changes in EC (all $P < 0.01$) involving increase of nucleoli/chromatin condensations, nucleus-to-cytosol ratio, capillary-like vacuolated structures, vessel-like acellular areas, migration through Matrigel, growth advantage in reseeded, and factor VIII content. All these actions were significantly inhibited by VEGF and VEGF receptor (VEGFR2) blockade. Of particular importance, a set of similar effects were detected in a human microvascular endothelial cell line (HMEC). With regard to gene expression, incubation with MG63-CM abolished endogenous VEGF mRNA and protein but induced a clear-cut increase in VEGFR2 mRNA expression in EC. In terms of mechanism, MG63-CM activates protein kinase B (PKB)/Akt, p44/p42-mitogen-activated protein kinase (MAPK)-mediated pathways, as suggested by both inhibition and phosphorylation experiments. In conclusion, tumor cells activate confluent, quiescent EC, promoting survival, phenotypic, and gene expression changes. Of importance, VEGF antagonism converts MG63-CM from protective to EC-damaging effects. vascular endothelial growth factor receptor 2; MG63-conditioned medium

ENHANCED ANGIOGENESIS is a major contributor to the poor clinical outcome of tumors. However, the mechanisms involved in tumor-related angiogenesis are still incompletely understood. In the past half-century, numerous studies have dealt with the effects of tumor cells and tumor-conditioned media (CM) on endothelial cells (EC). Mainly, these studies have demonstrated that malignant cells produce a host of factors that induce EC growth and favor vascular permeability, therefore facilitating tumor spreading (14, 15, 22). In other words, in the particular biology of the tumors, EC encompass the growth of malignant cells by means of a growth factor

signaling network. However, data are lacking on the effects of tumors on quiescent EC organized in a confluent, monolayer distribution, as found in normal vessels. These effects are particularly important, because they involve the type of interaction that tumors establish in vivo with intact endothelia, e.g., in the case of metastatic seeding.

Although vascular endothelial growth factor (VEGF) is a *primum inter pares* among all the agents involved in tumor vascularization, its specific role still has several major unknown aspects (12, 13). In a general view, VEGF and its tyrosine kinase receptors VEGFR1 (flt-1) and VEGFR2 (flk-1/KDR) are key mediators of physiological and pathological angiogenesis. They are expressed in most tissues during embryonic development but tend to be downregulated in the adult (12, 13). VEGFR2 mediates increased EC mitogenesis and permeability, whereas the role of VEGFR1 has not been yet sufficiently elucidated.

Upregulation of VEGF and VEGFRs has been observed during the induction of angiogenesis (12, 13). Such upregulation is particularly intense in hypoxic and neoplastic tissues. In the latter, current opinion maintains that tumor cells produce VEGF and stimulate VEGFR2 expression, therefore closing a loop of EC activation (18, 22). Although in this setting the pattern of expression of VEGFR2 appears to parallel VEGF expression, little is known about their mutual interaction and regulation. Moreover, tumor-produced VEGF can theoretically influence EC-produced, autologous endothelial VEGF; no data are yet available, however, to substantiate this hypothesis. Collectively, compelling evidence suggests that VEGF and its receptors are critical for tumor-associated angiogenesis and that they represent good targets for therapeutic intervention (22); however, data are still lacking for full understanding of the complete mechanisms of action of anti-VEGF strategies. In this regard, no description is currently available of the precise tumor-induced changes in confluent EC and the role of VEGF in each of these changes.

In light of the aforementioned rationale, the aim of the present study was to analyze the effect of tumors on monolayer, quiescent EC, with a focus on the role of VEGF and its receptors.

MATERIALS AND METHODS

EC culture. Bovine aorta EC were obtained, characterized, and cultured as described previously (7, 19, 20) in accordance with the

Address for reprint requests and other correspondence: C. Caramelo Díaz, Clínica de la Concepción, Universidad Autónoma de Madrid, Av. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings" of the American Physiological Society. Furthermore, comparative experiments were done with a human microvascular endothelial cell line (HMEC). HMEC were a gift from Dr. Manuel Ortiz de Landazuri (Immunology Laboratory, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain).

The conditions were modified when needed for the different experiments. Unless stated otherwise, all the experiments were done on confluent EC. Anti-VEGF (Sigma, St. Louis, MO) and anti-VEGFR2 (3.83; Imclone, New York) MABs were used for blockade of VEGF actions. Both antibodies have been extensively tested for their blocking properties in our laboratory and by the manufacturers (1, 7, 8). Because of its scarce availability, the noncommercial MAB 3.83 was only used in selected experiments. Crystal violet, hematoxylin and eosin, Masson trichrome, and immunocytochemistry techniques were applied to the EC in different conditions. Both the number of nucleoli/chromatin condensations and the nucleus-to-cytosol diameter ratio were calculated on digitized microphotographs examined by three independent observers who were blinded for the experimental conditions.

MG63 culture and CM preparation. Human MG63, a line of malignant osteoblast-like cells (American Type Culture Collection), were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) + 10% FBS. For preparing CM, MG63 were cultured in MEM-D-valine without FBS for 24 h; medium was collected, filtered, and added to the EC without further maneuvers. When needed, a similar incubation was carried out with the hypoxia-mimicking agent CoCl_2 (10 μM) added to the medium.

EC damage and proliferation. EC damage was addressed by flow cytometry (7). Lactate dehydrogenase (LDH) release was assessed in confluent EC maintained for 24–48 h in growth factor-deficient conditions (MEM-D-valine without FBS) (7, 8). Two hundred microliters were sampled at different times, and percent LDH release was calculated. Cell counting was performed in a Neubauer chamber. Cell proliferation was quantified with a cell proliferation ELISA bromodeoxyuridine (BrdU) kit (Roche, Madrid, Spain). Experiments with a Transwell system were used for assessing the direct effect of the presence of MG63 on EC (see Fig. 1C for description).

mRNA isolation and reverse transcriptase-PCR. Total RNA was extracted as described previously with the TriPure isolation reagent (Boehringer Mannheim, Madrid, Spain) after different times of exposure (3, 9, 24 h) to the treatments (see below for further details) (1, 7). Reverse transcriptase (RT)-PCR was performed with oligonucleotide primers of bovine VEGF, VEGFR1, and VEGFR2, synthesized as described previously (7).

VEGF Western blot and ELISA. Samples were processed and analyzed by Western blotting as described previously (7). Anti-VEGF MAB (1:250; Sigma) was used as antibody. VEGF concentrations in MG63-CM were measured by a VEGF ELISA (Accucyte Human VEGF, Cytimmune Sciences).

p44/p42-mitogen-activated protein kinase and Akt Western blots. Western blots for phospho-p44/p42-mitogen-activated protein kinase (MAPK), phospho-Akt (Ser473), and their respective loading controls [total p44/p42-MAPK and protein kinase B (PKB)/Akt] were performed following the manufacturer's instructions (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) inhibitor LY-294002 (20 μM ; Sigma) and the MAPK kinase (MEK) inhibitor PD-98059 (50 μM ; Calbiochem, La Jolla, CA) were used during the 45 min before addition of the medium.

Matrigel invasion assay. The activated state of EC was further assessed by their penetration into growth factor-reduced Matrigel (Becton Dickinson, Barcelona, Spain).

Immunocytochemistry of factor VIII expression. Cells grown to confluence on tissue culture chamber slides (Becton Dickinson USA) were submitted to the different experimental maneuvers, washed with PBS, incubated in MEM-D-valine-0.5% FBS, MG63-CM, and MG63-CM- CoCl_2 for an additional 5 days, and then fixed with Merckofix

(Merck). Immunostaining was performed by the alkaline phosphatase method, using factor VIII (1:1,000, polyclonal rabbit; Sigma) as primary antibody. Similarly fixed cultures were treated with nonimmunogenic rabbit IgG as negative control. After being washed with PBS, cells were incubated with biotinylated swine anti-rabbit IgG (Dako, Glostrup, Denmark) for 30 min, sequentially followed by incubation with avidin-biotin-peroxidase complex (Dako) and 3,3'-diaminobenzidine (Sigma).

Statistics. Results are expressed as means \pm SE. Unless stated otherwise, each value corresponds to a minimum of five triplicate experiments. Comparisons were done by ANOVA or paired and unpaired Student's *t*-test, when appropriate. The Fisher and Scheffé tests for multiple comparisons were used to determine the *P* value, which was considered significant at <0.05 . All statistic analyses were performed with the SPSS 8.0 package (Jandel, San Rafael, CA).

RESULTS

Tumor-CM-induced changes in confluent, quiescent EC. Exposure to MG63-CM significantly increased survival of EC in serum-free conditions, as assessed by flow cytometry (Fig. 1A). A similar protective effect by MG63-CM was obtained on the microvascular endothelial line HMEC (Fig. 1B). EC-CM had no effect on EC survival. In the same regard, MG63-CM significantly decreased LDH release [fresh media (FM), $100 \pm 3.9\%$; 20% FBS, $50 \pm 3.4\%$ ($P < 0.001$ with respect to FM); MG63-CM, $54 \pm 4.2\%$ ($P < 0.001$ with respect to FM); CM of EC, $98 \pm 3.8\%$]. A related effect was obtained by cocultivating EC with MG63 in a Transwell system (Fig. 1C).

In addition, we found that, in the absence of FBS, no cell proliferation, as assessed by percent BrdU incorporation, occurred in confluent, quiescent EC treated with MG63-CM or exogenous VEGF (FM: $68 \pm 3\%$, MG63-CM: $66 \pm 9\%$, MG63-CM + CoCl_2 : $53.8 \pm 7\%$, 5×10^{-10} M VEGF: $68.8 \pm 4\%$; $n = 3$ triplicate experiments). In these conditions, 20% FBS induced an increase in BrdU incorporation of $217 \pm 43\%$ ($P < 0.001$). Furthermore, no changes in either glucose or pH of the different media were detected after 24-h incubation (data not shown). Of importance, MG63-CM contained increased amounts of VEGF (FM: undetectable levels, MG63-CM: 13.5 ± 1.2 ng/ml; $P < 0.01$); VEGF levels were even higher in the presence of CoCl_2 (MG63-CM + 10 μM CoCl_2 : 26.8 ± 1.5 ng/ml; $P < 0.01$ with respect to MG63-CM alone and $P < 0.001$ with respect to FM).

Incubation with MG63-CM induced relevant phenotypic changes in confluent EC, which were consistent with an activated state. Of specific importance, no phenotypic changes were detected by treating the EC with exogenous VEGF (5×10^{-10} M) or with EC-CM (with or without CoCl_2 ; images not shown). The changes produced by MG63-CM are depicted in Fig. 2 and include the following. 1) The number of nucleoli/chromatin condensations (EC + MG63-CM 5.3 ± 0.7 vs. EC-FM 3.4 ± 0.4 nucleoli/cell; $P < 0.01$) and the nucleus-to-cytosol ratio (FM 0.41 ± 0.09 control; MG63-CM- CoCl_2 0.68 ± 0.08 ; $P < 0.01$) were increased. 2) Acellular areas appeared, consistent with attempted capillarization (Fig. 2B,f). 3) Vacuolated, seal-shaped EC (Fig. 2, A,c and B,d) appeared; these structures were also consistent with attempted capillarization in bidimensional growth conditions and resemble those found in malignant angiomas (17). The aforementioned changes were more marked when the EC were incubated with MG63-CM + CoCl_2 (10 μM). 4) Migration of the EC within Matrigel occurred; no significant migration occurred by incu-

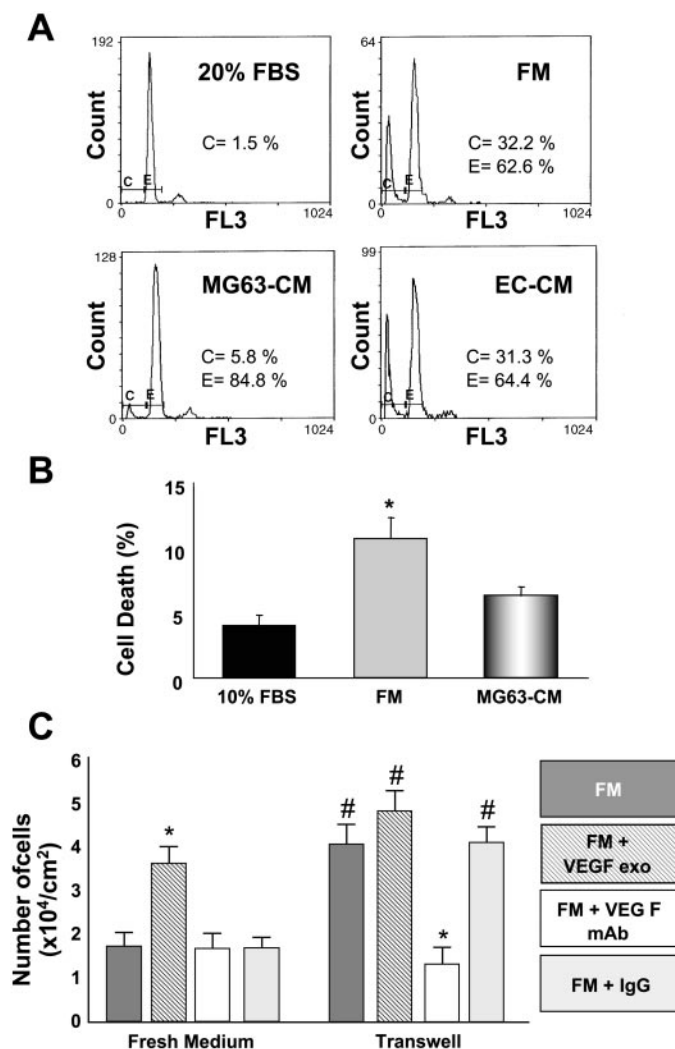


Fig. 1. A: flow cytometry analysis. Endothelial cells (EC) were analyzed for DNA content by propidium iodide staining and flow cytometry. Measurements were made 48 h after FBS deprivation (1%). Numbers show percentage of living (E) or dead (C) cells. x-Axis, fluorescence intensity of propidium iodide; y-axis, cell number. Traces are representative of a minimum of 5 experiments with similar results. B: cell death of human microvascular endothelial cells (HMEC) by flow cytometry analysis. The effects of 10% FBS, fresh medium (FM), and MG63-conditioned medium (CM) are shown. Bars represent the mean values of 4 triplicate experiments. Different concentrations of FBS were used in EC and HMEC (20% and 10%, respectively) because of the different growth rate of the two types of cells. * $P < 0.01$ with respect to the other 2 conditions. C: Transwell experiments. EC were cultured to confluence in P6 plates and MG63 were seeded at 10^4 cells/cm² and incubated 24 h in Millicell-PCF. Both cell types were serum deprived in MEM-D-valine with 1% FBS 24 h before the cocubation and thereafter incubated together in MEM-D-valine in the presence of exogenous (exo) vascular endothelial growth factor (VEGF; 10 ng/ml), anti-VEGF MAb (1 μ g/ml), or nonspecific IgG (1 μ g/ml). Bars on left represent different controls in the absence of MG63; bars on right represent the cocubation experiment in Transwell ($n = 5$). * $P < 0.01$ with respect to the other 3 columns of the group; # $P < 0.05$ with respect to fresh medium without MG63.

bating the EC with FM (Table 1). 5) Treatment with MG63-CM and MG63-CM-CoCl₂ induced a marked increment in factor VIII, as assessed by immunocytochemistry. Moreover, factor VIII distribution was different in MG63-CM-treated EC with respect to nonconditioned media or EC-CM-treated EC (Fig. 2C). Changes induced by the addition of

anti-VEGF antibody are commented on below. 6) Pretreatment of EC with MG63-CM induced growth advantage in reseeding in FBS-poor conditions. This growth advantage was more marked when the CM was obtained from MG63 + CoCl₂ (Table 2).

Additional experiments were performed with HMEC to analyze whether the findings in EC originated in a great vessel were also valid in EC of microvascular type. HMEC growth rate and phenotype were rather different than those of EC (Fig. 2D); however, a significant protective effect on HMEC was also found in the presence of MG63-CM (Figs. 1B and 2D).

Role of VEGF and VEGFR2-mediated pathways in changes induced by MG63-CM on confluent, quiescent EC. After the aforementioned alterations were identified, we analyzed whether VEGF was a critical factor in the protective effect of MG63-CM. These experiments revealed a remarkably important fact, i.e., that the inhibition of VEGF effects by a specific anti-VEGF antibody not only blocks the protection induced by MG63-CM but also unmasks a deleterious effect of MG63-CM on EC (Fig. 3, A and B). In HMEC, however, both anti-VEGF and anti-VEGFR2 induced a complete reversal of the MG63-CM protective effect, but without inducing a significant increase in cell death over the baseline (Fig. 3C).

Treatment with the anti-VEGF antibody completely blocked the effect of MG63-CM on EC phenotype (Fig. 2) and migration within Matrigel (Table 1). In the same regard, the number of nucleoli, as well as the nucleus-to-cytosol ratio, were significantly reduced in the presence of anti-VEGF MAb (MG63-CM-CoCl₂ + anti-VEGF MAb: 3.9 ± 0.6 nucleoli/cell and nucleus-to-cytosol ratio 0.41 ± 0.06 , both $P < 0.01$ with respect to MG63-CM-CoCl₂ without anti-VEGF MAb; for both measurements, see above for comparison). As shown in Fig. 2, acellular spaces were markedly reduced when the anti-VEGF MAb was present in the media. Moreover, the formation of vacuolated capillary-like structures was almost abolished in the presence of the anti-VEGF MAb (2 ring shaped/402 EC; $P < 0.001$; Fig. 2) compared with EC treated with MG63-CoCl₂ (98 ring shaped/394 EC) or MG63-CoCl₂ + nonspecific IgG (72 ring shaped/376 EC). In addition, treatment with anti-VEGF MAb significantly decreased the MG63-CM-induced increase in factor VIII expression; an identical image was observed by using anti-VEGFR2 (MAb 3.83). All the experiments using anti-VEGF or anti-VEGFR2 antibodies included controls incubated in identical conditions but exposed to nonspecific IgG of the same type of anti-VEGF and 3.83 antibodies. No changes were detected in these controls with respect to MG63-CM or FM without antibodies (data not shown).

Role of tumor-CM on autologous VEGF and VEGFR2 mRNA expression in EC. Incubation with MG63-CM induced major changes in the expression of VEGF by EC. MG63-CM markedly inhibited autologous VEGF mRNA compared with the expression detected in the presence of FM (Fig. 4A); a similar result was obtained for VEGF protein (Fig. 4B). The fact that the addition of anti-VEGF MAb was not capable of blocking the MG63-CM-induced abolition of autologous VEGF expression indicates that this abolition was not related to the presence of VEGF in the MG63-CM. Therefore, molecules different from VEGF contained in the MG63-CM are probably involved, e.g., other growth factors.

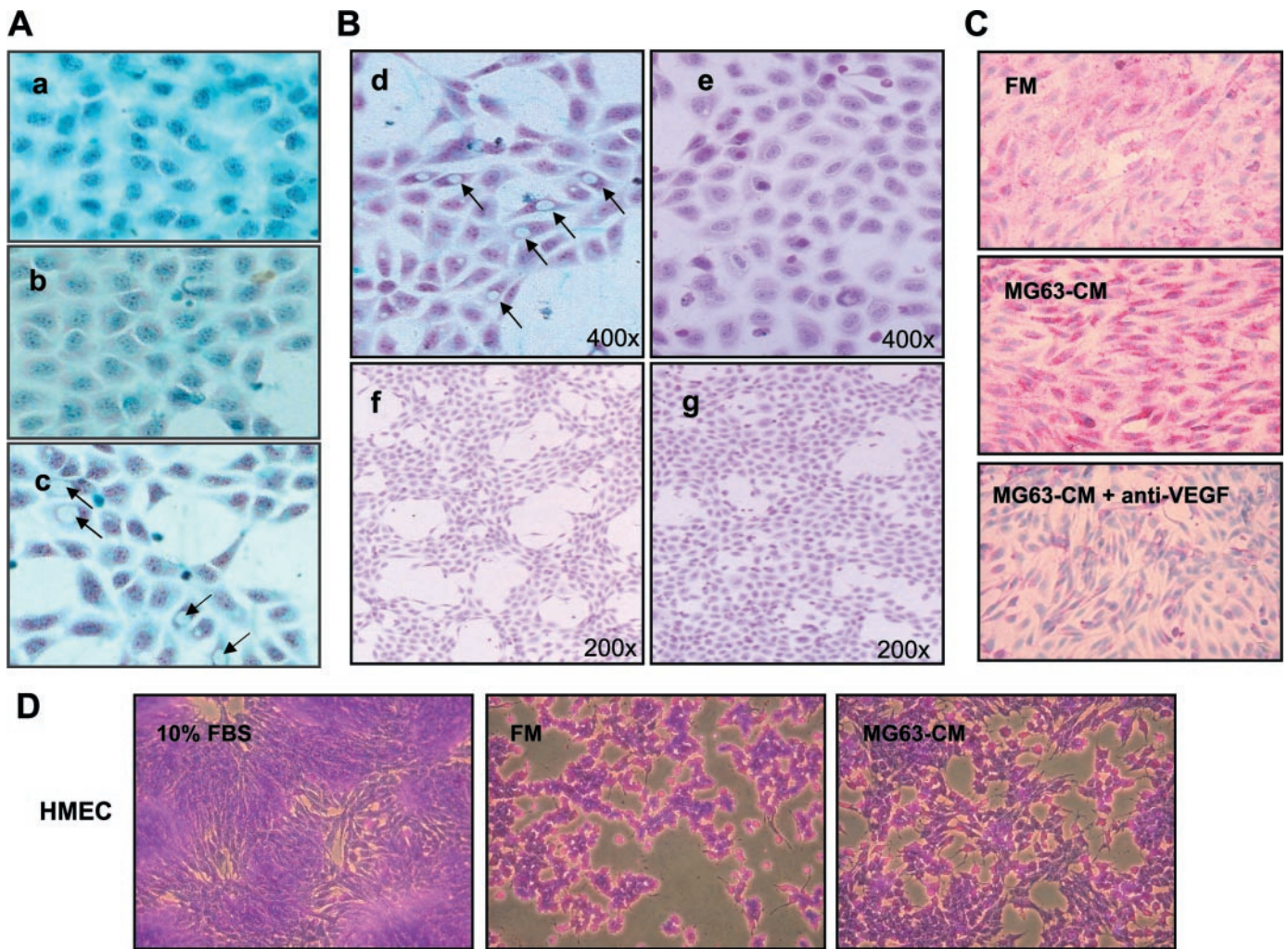


Fig. 2. Phenotypic changes after exposure to tumor cell (MG63)-CM and MG63-CM + CoCl₂. *A* and *B*: Masson stain. *C*: immunocytochemistry of factor VIII expression. *D*: crystal violet stain. Experiments were done both in the presence and the absence of anti-VEGF MAb. *A*: *a*: control EC (MEM-D-valine-1% FBS); *b*: EC treated with MG63-CM; *c*: EC treated with MG63-CM + CoCl₂. Compared with *a*, in *b* and *c* cell junctions are widened and acellular areas have appeared. Moreover, the nuclear size has increased in relation to the cytosol. Changes are more marked, and capillary-like, seal-shaped structures, are evident in *c* (arrows) ($\times 400$). *B*: *d* and *f*: EC exposed to MG63-CM + CoCl₂; *e* and *g*: EC exposed to MG63-CM + CoCl₂ + anti-VEGF MAb. As can be observed, the anti-VEGF MAb blocked almost completely the induction of the seal-like capillary structures (arrows, *d*). On the other hand, only a partial regression of the acellular areas was observed (*g*). *C*: MG63-CM increased factor VIII in EC in a VEGF-dependent manner, as assessed by simultaneous treatment with anti-VEGF MAb. *D*: HMEC incubated for 48 h in 3 different conditions: 10% FBS, fresh medium (FM), and MG63-CM.

To further analyze the mechanisms involved in the effect of MG63-CM, the expression of VEGFR2 mRNA was assessed by RT-PCR. As can be seen in Fig. 5, MG63-CM induced an increase in VEGFR2 mRNA expression in samples studied at 0, 3, 9, and 24 h. In terms of mechanism, the VEGFR2 increase was critically related to a paracrine effect secondary to VEGF present in the MG63-CM. This VEGF acts through the VEGFR2 receptor, as judged by the marked decrease in the stimulation of VEGFR2 expression in the presence of anti-VEGF antibody and anti-VEGFR2 antibodies (Fig. 5). With respect to the VEGFR1/flt-1 receptor, no differences in mRNA expression were detected in the same samples used for the study of VEGFR2 expression (Fig. 5).

Effect of MG63-CM on Akt and MAPK phosphorylation. Additional experiments were performed to analyze the putative pathways involved in EC activation by MG63-CM.

The pathways analyzed were chosen on basis of the known signaling routes of VEGF. Incubation of confluent EC in the presence of MG63-CM induced a significant increase in Akt and MAPK phosphorylation (Fig. 6). Both increased phosphorylations were blocked in the presence of the PI3-kinase inhibitor LY-294002 and the MEK inhibitor PD-98059, respectively (Fig. 6).

DISCUSSION

The data obtained in the present study are useful to clarify previously unknown aspects of the behavior of EC in the tumor microenvironment, referring not just to EC proliferation but to a spectrum of EC activation. More specifically, some of our findings apply to the effects on angiogenic events that are related to the occurrence of hypoxia within malignant tumors,

Table 1. *Effect of MG63-CM on Matrigel penetration by endothelial cells*

	EC/field
FM	12±5
FM+IgG	14±3
FM+VEGF MAb	17±6
CM	237±36*
CM+IgG	220±42*
CM+VEGF MAb	88±15*†
FM+3.83	15±5
CM+3.83	16±5‡

Values are means ± SE. Endothelial cells (EC) were tested for their ability to migrate in response to MG63-conditioned medium (CM). EC were seeded at 10⁴ cell/well and incubated 48 h with the different media. EC/field, no. of cells that have traversed the Matrigel, as counted in marked fields. FM, fresh medium, no FBS. CM: MG63-CM, anti-VEGF MAb (1 µg/ml), 3.83 MAb (0.5 µg/ml), or IgG (0.5 µg/ml). **P* < 0.001 with respect to FM. †*P* < 0.01 with respect to CM. ‡*P* < 0.001 with respect to CM.

as assessed by means of MG63-CM with CoCl₂. A specific feature of the present study is that the EC were in the confluent, monolayer state actually adopted by quiescent endothelia in the normal vessel wall. This issue is particularly relevant to understanding the response of the endothelium in metastatic seeding; in the latter case, tumor cells interact with a priori intact endothelia in different organs.

The literature on the effects of tumor-CM on EC was mostly generated in the 1970s and 1980s. The studies were mainly focused on two major subjects, namely, the effect of tumors on EC proliferation and tumor-induced endothelial permeability (6, 15). Rather unexpectedly, the aforementioned studies contained almost no information on the actions of tumor cells and/or tumor cell-CM on confluent EC in the contact-inhibited state.

Our study has detected significant effects of tumor-CM on EC phenotype, indicating activation. To our knowledge, the pattern of EC activation in the presence of tumor-CM and tumor cells, namely, MG63-CM, is described for the first time, and it includes marked increases in nuclear size and number of nucleoli/cromatin condensations, as well as formation of capillary-like structures. The changes found in our experiments with MG63-CM are particularly illustrative of the magnitude of the activation of normal EC in the tumor microenvironment and resemble those described *in vivo* as an angiogenic phenotype (21). The effects on factor VIII expression are of special

Table 2. *EC growth advantage after pretreatment with MG63-CM*

	48 h	72 h
FM	4.6±0.8(46)	6.4±0.7(64)
FM+IgG	4.5±0.3(45)	6.2±1.1(62)
FM+VEGF MAb	5.5±0.7(48)	6.7±0.8(67)
CM	9.9±1.3(99)†	5.9±1.1(59)
CM+VEGF MAb	5.0±1.2(50)	3.6±1.0(36)†
CM+CoCl ₂	10.6±0.8(106)†	8.4±1.5(84)†
CM+CoCl ₂ +VEGF MAb	5.0±1.1(50)	5.0±0.8(50)*

Values (expressed as 10⁴ cells/cm²) are means ± SE. Confluent EC were incubated 24 h with the different media; thereafter, EC were trypsinized and reseeded in MEM-D-valine with 1% FBS. Cells were counted at 48 and 72 h. FM, serum-deprived medium; CM, MG63-CM + CoCl₂ (10 µM); values in parentheses are % yield of the reseeded with respect to total EC seeded. **P* < 0.05, †*P* < 0.01 with respect to FM.

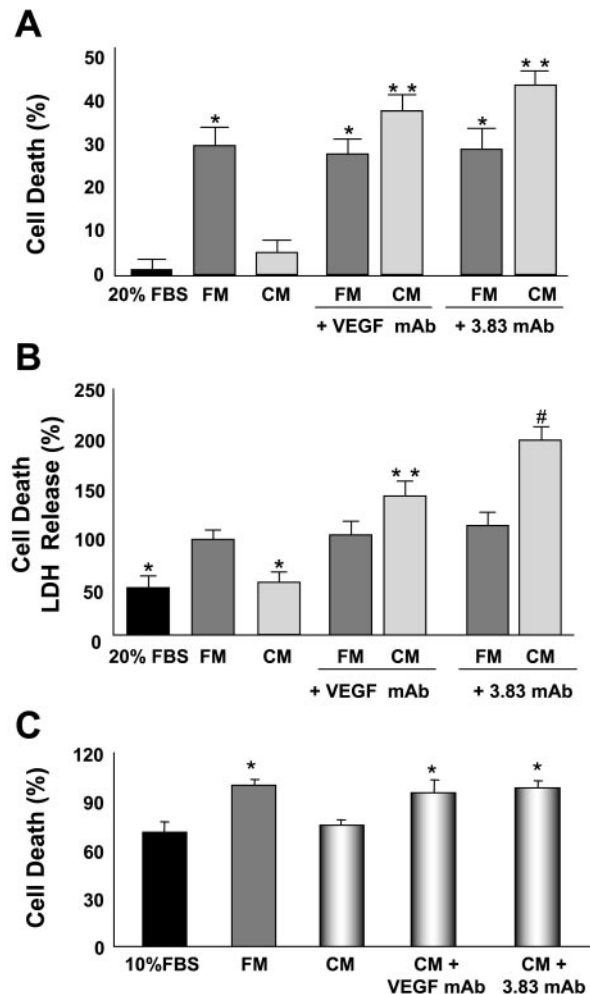


Fig. 3. Cytoprotective effect of MG63-CM on EC. All incubations, except those specifically identified, were done in the absence of FBS. Data are means ± SE of 4 experiments with triplicate samples. Anti-VEGF MAb: 1 µg/ml; 3.83 MAb [anti-VEGF receptor (VEGFR)2]: 0.5 µg/ml. A: % of cell death at 48 h (flow cytometry). **P* < 0.01 with respect to 20% FBS; ***P* < 0.01 with respect to CM and *P* < 0.05 with respect to FM (*n* = 4; triplicate experiments). B: % of lactate dehydrogenase (LDH) release; 100% cell death was assigned to FM (fresh serum-deprived medium). **P* < 0.05 decrease with respect to FM; ***P* < 0.05 increase with respect to FM; #*P* < 0.01 increase with respect to FM (*n* = 4; triplicate experiments). C: relative cell death measured by flow cytometry analysis at 48 h. Effects of the different incubation conditions on HMEC (100% cell death was assigned to FM) are shown. As can be seen, both anti-VEGF and anti-VEGFR2 antibodies inhibited the protective effect of MG63-CM. No effects of anti-VEGF and anti-VEGFR2 antibodies were detected in the incubations with fresh medium. **P* < 0.05 with respect to CM.

interest regarding the potential role of VEGF in the procoagulating activity of tumors and deserve further attention.

In addition to the morphological changes, our data demonstrate that soluble factors present in MG63-CM have protective effects against FBS deprivation. Of utmost importance, for its significance in terms of putative therapeutic applications, this protective response of MG63-CM became deleterious when VEGF was blocked. This finding reveals, for the first time, that on blockade of the key protective mediator VEGF, EC damage is significantly potentiated by tumor-borne products and therefore highlights the importance of autologous VEGF.

The anti-EC effects of MG63-CM in the presence of VEGF or VEGFR2 blockade are most probably conveyed through

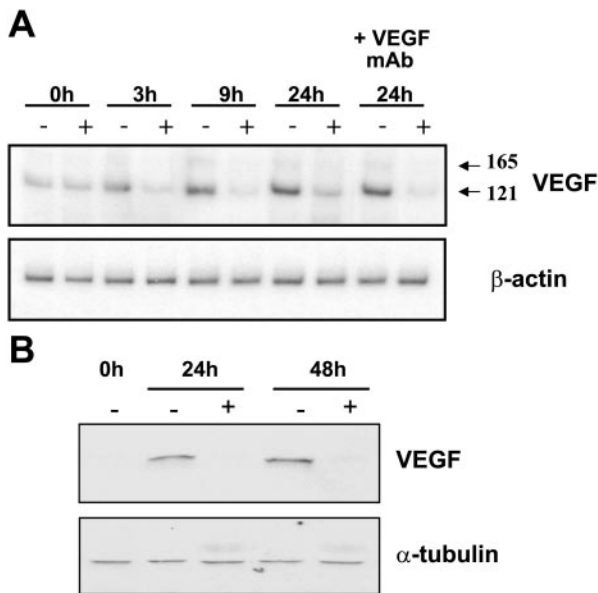


Fig. 4. A: blockade of expression of VEGF mRNA at different times as assessed by RT-PCR. The assays were carried out in the presence of MG63-CM or FM: +, CM; -, FM. Times indicate duration of incubation before RNA isolation. β-Actin was used as internal control. VEGF mRNA increased progressively in the serum-deprived conditions but not when MG63-CM was present. Images are representative of 4 experiments with similar results. B: inhibition of autocrine VEGF expression by MG63-CM. Images of VEGF Western blot in protein samples extracted from cells treated with MG63-CM (+) or FM (-) for 24 or 48 h or nontreated cells (0 h) are shown. α-Tubulin was used as control of equal gel loading. Images are representative of 3 experiments with similar results.

soluble factors. Several antiangiogenic agents have been described in tumors, e.g., angiostatin, endostatin, and thrombospondin (10). However, the precise identification of the deleterious factors contained in the MG63-CM, albeit of interest, is beyond the specific aims of the present research.

Our results also show that the effects of tumor-CM and VEGF blockade are relevant in EC of microvascular origin. The exis-

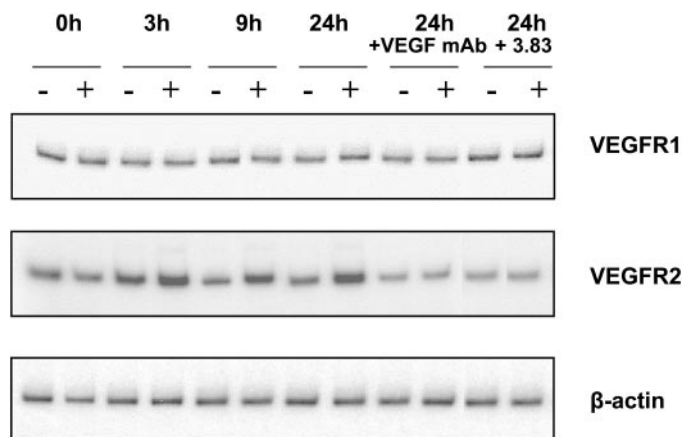


Fig. 5. Absence of effect on VEGFR1 expression and stimulation of VEGFR2 expression by MG63-CM. Expression of VEGFR1 and VEGFR2 mRNA as assessed by RT-PCR is shown. These assays were performed in the presence of MG63-CM (+) or FM (-), in conditions similar to those in Fig. 3. Times indicate length of EC incubation before RNA isolation. Antibodies were used at the same concentrations in Fig. 3. β-Actin was used as internal control. Figure is representative of 3 experiments yielding similar results.

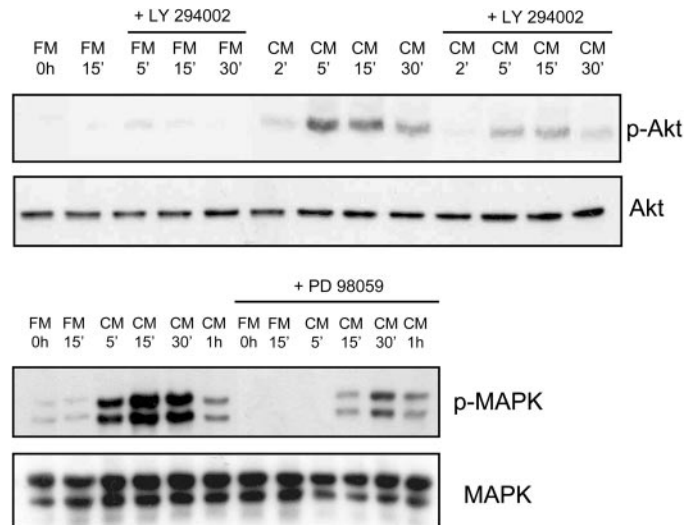


Fig. 6. Effect of MG63-CM on protein kinase B (PKB)/Akt and mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphorylation. Confluent EC were incubated in FM or MG63-CM (CM) for times indicated. Akt and MAPK phosphorylation (p-Akt and p-MAPK respectively), as well as total Akt and MAPK, were determined by Western blotting. A phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) inhibitor (LY-294002; 20 μM) or a MAPK kinase (MEK) inhibitor (PD-98059; 50 μM) was used when appropriate.

tence of some differences between the findings in EC and HMEC, e.g., death rate, phenotype, and time to confluence, can be traced to the fact that HMEC are a continuous cellular line with a markedly different growth rate and, more importantly, with metabolic modifications aimed to ensure a more efficient survival. In this regard, the results obtained in the EC in primary culture are probably closer to the actual properties of EC in vivo.

The use of anti-VEGF antibodies or drugs as antiangiogenic agents is generally supposed to occur because of the blockade of EC proliferation but not the facilitation of EC damage by tumor-related factors. Therefore, our data extend the scope of putative effects of anti-VEGF therapy in cancer to antiprotective actions on EC. Accordingly, our results add further evidence for the interpretation of the mechanisms of the antiangiogenic effect of VEGF antagonism in tumors and provide a source of explanation for the vessel regression observed on VEGF blockade (2, 3).

The data demonstrating that MG63-CM suppress autologous VEGF gene expression in EC are potentially relevant in terms of interpreting the deleterious effects of VEGF withdrawal or antagonism (2, 3, 11, 16, 25). Tumor-MG63-CM suppresses autologous VEGF, therefore rendering the EC dependent on exogenous, tumor-generated VEGF. Our results agree with findings in human tumors showing the absence of VEGF mRNA in EC from tumors in which VEGF is produced by the neoplastic cells (4, 5, 9, 19). In these, intratumoral hypoxia should have stimulated production of VEGF by the EC within the tumor (25); in fact, the absence of such production suggests that it may actually be suppressed by the VEGF present in the tumor microenvironment. These particular results add new information to previously published work by Wang et al. (24). These authors reported that tumor-CM regulates the expression of VEGF receptors on EC surface, but they did not analyze the fate of autologous VEGF expression by EC (24).

Several of the effects found with the anti-VEGF and anti-VEGFR2 blocking MABs deserve special comment. First, the

induction of EC growth advantage in reseeded, as well as the induction of Matrigel penetration, indicate that VEGF is a critical factor in triggering properties of the EC that are relevant for the mechanism of metastatic seeding. Second, the different degree of blockade of diverse effects by the anti-VEGF antibody compared with the anti-VEGFR2 antibody suggests either that a more relevant role of VEGFR1 may exist in some of the MG63-CM actions or that other types of VEGF, e.g., VEGF-C or VEGF-D, are involved.

In terms of mechanism, the present results reveal that MG63-CM activates the two main survival pathways, i.e., PI3-kinase/Akt and p44/p42-MAPK. These pathways are involved in the intracellular signaling routes of several growth factors, including VEGF (23). A more precise definition of these routes is beyond the scope of the present study. However, experiments are presently being performed in our laboratory to specifically characterize precise mechanisms involved in the Akt and p44/p42-MAPK activation by MG63-CM.

The findings described herein provide new information for understanding anti-VEGF strategies in the therapy of tumors. The presence of high amounts of exogenous VEGF appears to be critical in allowing the EC to withstand the challenge of deleterious factors produced by the tumor cells. Furthermore, the fact that tumor medium dramatically downregulates autologous VEGF expression in EC may have potential relevance in terms of the response of these EC to forthcoming aggressions. The finding that the interference with VEGF- or VEGFR2-related effects determines a growth disadvantage on reseeded, which interferes with matrix penetration as well, is potentially important for therapeutic approaches against tumor metastatization and local tissue invasion.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. P. Esbrit (Fundación Jiménez Díaz, Madrid) and Dr. M. Ortiz de Landazuri (Hospital de la Princesa, Madrid) for the gift of MG63 and HMEC cells.

GRANTS

This study was financed by grants of Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 01/0345, FIS 01/3131, and PI 020486), Red Cardiovascular (Instituto de Salud Carlos III), Comunidad Autónoma de Madrid (CAM 08.3/0010/2000.1 and 0010/2002.3), Fundación Mapfre Medicina, and Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica (IRSIN). M. A. Castilla is a fellow of PEN.SA-IRSIN; F. Neria is a fellow of Fundación C. Rábago; F. R. González-Pacheco and S. Jiménez are fellows from CAM and MVAA; S. Yagüe and J. J. P. Deudero are fellows of Instituto de Salud Carlos III.

REFERENCES

- Alvarez-Arroyo MV, Yague S, Wenger RM, Pereira DS, Jimenez S, Gonzalez-Pacheco FR, Castilla MA, Deudero JJP, and Caramelo C. Cyclophilin-mediated pathways in the effect of cyclosporin A on endothelial cells: role of vascular endothelial growth factor. *Circ Res* 91: 202–209, 2002.
- Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Podes D, and Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 103: 159–165, 1999.
- Benjamin LE and Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8761–8766, 1997.
- Brekken RA, Huang X, King SW, and Thorpe PE. Vascular endothelial growth factor as a marker of tumor endothelium. *Cancer Res* 58: 1952–1959, 1998.
- Brekken RA, Overholser JP, Stastny VA, Waltenberger J, Minna JD, and Thorpe PE. Selective inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor 2 (KDR/Flk-1) activity by a monoclonal anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice. *Cancer Res* 60: 5117–5124, 2000.
- Cai J, Jiang WG, and Mansel RE. Phosphorylation and disorganization of vascular-endothelial cadherin in interaction between breast cancer and vascular endothelial cells. *Int J Mol Med* 4: 191–195, 1999.
- Castilla MA, Arroyo MV, Aceituno E, Aragoncillo P, Gonzalez-Pacheco FR, Texeiro E, Bragado R, and Caramelo C. Disruption of cadherin-related junctions triggers autocrine expression of vascular endothelial growth factor in bovine aortic endothelial cells: effects on cell proliferation and death resistance. *Circ Res* 85: 1132–1138, 1999.
- Castilla MA, Caramelo C, Gazapo RM, Martin O, Gonzalez-Pacheco FR, Tejedor A, Bragado R, and Alvarez Arroyo MV. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in endothelial cell protection against cytotoxic agents. *Life Sci* 67: 1003–1013, 2000.
- Chan AS, Leung SY, Wong MP, Yuen ST, Cheung N, Fan YW, and Chung LP. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the anaplastic progression of astrocytoma, oligodendroglioma, and ependymoma. *Am J Surg Pathol* 22: 816–826, 1998.
- Chavakis E and Dimmeler S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 887–893, 2002.
- Dreys J, Hofmann I, Hugenschmidt H, Wittig C, Madjar H, Muller M, Wood J, Martiny-Baron G, Unger C, and Marme D. Effects of PTK787/ZK 222584, a specific inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, on primary tumor, metastasis, vessel density, and blood flow in a murine renal cell carcinoma model. *Cancer Res* 60: 4819–4824, 2000.
- Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 11: 617–624, 2000.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Recent Prog Horm Res* 55: 15–35, 2000.
- Folkman J and Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. *Nature* 288: 551–556, 1980.
- Folkman J, Haudenschild C, and Zetter BR. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5217–5221, 1979.
- Fong TA, Shawver LK, Sun L, Tang C, App H, Powell TJ, Kim YH, Schreck R, Wang X, Risau W, Ullrich A, Hirth KP, and McMahon G. SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization, and growth of multiple tumor types. *Cancer Res* 59: 99–106, 1999.
- Hatva E, Bohling T, Jaaskelainen J, Persico MG, Haltia M, and Alitalo K. Vascular growth factors and receptors in capillary hemangioblastomas and hemangiopericytomas. *Am J Pathol* 148: 763–775, 1996.
- Kranz A, Mattfeldt T, and Waltenberger J. Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. *Int J Cancer* 84: 293–298, 1999.
- Lopez Farre A, Riesco A, Espinosa G, Digiuni E, Cernadas MR, Alvarez V, Monton M, Rivas F, Gallego MJ, Egido J, and Caramelo C. Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation* 88: 1166–1171, 1993.
- Monton M, Castilla MA, Alvarez Arroyo MV, Tan D, Gonzalez-Pacheco FR, Lopez Farre A, Casado S, and Caramelo C. Effects of angiotensin II on endothelial cell growth: role of AT-1 and AT-2 receptors. *J Am Soc Nephrol* 9: 969–974, 1998.
- Ortega N, Jonca F, Vincent S, Favard C, Ruchoux MM, and Plouet J. Systemic activation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/flk-1 selectively triggers endothelial cells with an angiogenic phenotype. *Am J Pathol* 151: 1215–1224, 1997.
- Papetti M and Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C947–C970, 2002.
- Shiojima I and Walsh K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res* 90: 1243–1250, 2002.
- Wang D, Donner DB, and Warren RS. Homeostatic modulation of cell surface KDR and Flt1 expression and expression of the vascular endothelial cell growth factor (VEGF) receptor mRNAs by VEGF. *J Biol Chem* 275: 15905–15911, 2000.
- Wood JM, Bold G, Buchdunger E, Cozens R, Ferrari S, Frei J, Hofmann F, Mestan J, Mett H, O'Reilly T, Persohn E, Rosel J, Schnell C, Stover D, Theuer A, Towbin H, Wenger F, Woods-Cook K, Menrad A, Siemeister G, Schirmer M, Thierauch KH, Schneider MR, Dreys J, Martiny-Baron G, and Totzke F. PTK787/ZK 222584, a novel and potent inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases, impairs vascular endothelial growth factor-induced responses and tumor growth after oral administration. *Cancer Res* 60: 2178–2189, 2000.

Efectos del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y de medios tumorales en la activación y supervivencia de células endoteliales.

Effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and tumor media on endothelial cell activation and survival.

Neria F., Caramelo C., R. González-Pacheco F., P. Deudero J. J., Castilla M. A.

RESUMEN

Introducción: Los efectos de los tumores sobre la activación de células endoteliales (CE) se conocen de manera insuficiente. Nuestro estudio analiza la acción sobre CE del medio condicionado (MC) de células tumorales de una línea (MG-63) productora de VEGF.

Material y Métodos: Las CE en monocapa se expusieron a MC-MG63 \pm Cl₂Co, como símil de hipoxia.

Resultados: Los medios tumorales (\pm Cl₂Co) aumentan la supervivencia de las CE, sin inducir proliferación (activación de AKT y MAP quinasa). Los MC inducen marcados cambios fenotípicos de transformación angiogénica en las CE. En términos de mecanismo, estos cambios dependen de VEGF, a través del receptor VEGFR-2. La inhibición de VEGF/VEGFR-2 por anticuerpos específicos convierte el patrón protector de los MC en tóxico, revelando la importancia del VEGF en la resistencia del endotelio a acciones deletéreas tumorales. En expresión génica, el MC-MG63 suprime la expresión de ARNm y proteína de VEGF, por un mecanismo independiente del VEGF exógeno. Por el contrario, el MC-MG63 aumenta el ARNm de VEGFR2, en una manera VEGF-dependiente.

Conclusión: Las células tumorales promueven supervivencia sin proliferación y cambios mayores de expresión génica en CE confluentes y quiescentes. El VEGF autólogo es un elemento protector esencial.

Palabras clave: Célula endotelial. Supervivencia. VEGF. VEGFR2. Tumores.

ABSTRACT

Introduction: The effects of tumor on endothelial cell (EC) activation are insufficiently known. Our study analyzes the action of conditioned media (CM), obtained from a vascular endothelial growth factor (VEGF)-producing cell line (MG63) on EC.

Material and Methods: Monolayer EC were exposed to CM-MG63 \pm Cl₂Co, used as hypoxia-like agent.

Results: Both media (\pm Cl₂Co) increase EC survival, without inducing proliferation (AKT and MAP Kinase activation). The CM induced marked phenotypic changes on EC, consisting with angiogenic activation. In terms of mechanism, these changes depend on VEGF/VEGFR2 as specific blocking antibodies shift the protective pattern of CM on EC to a toxic mode, revealing the importance of VEGF in the endothelial resistance against tumor-induced deleterious actions. In terms of gene expression of VEGF mRNA and protein by an exogenous VEGF-independent mechanism. On the contrary, CM-MG63 increases the mRNA of VEGFR2, in a VEGF-dependent manner.

Conclusion: Tumor cells promote monolayer EC survival without proliferation, and mayor changes in gene expression on confluent, quiescent EC. Autologous VEGF is an essential protective element.

Key words: Endothelial cell. Survival. VEGF. VEGFR2. Tumor.

Investigación Cardiovascular, 2006; 9: 130-147

Correspondencia / correspondence

C. Caramelo
Laboratorio de Nefrología e Hipertensión
Fundación Jiménez Díaz
Avda. Reyes Católicos 2
28040-Madrid
ccaramelo@fjd.es

INTRODUCCIÓN

Conocer los mecanismos que regulan la vascularización normal y patológica de los tejidos es un objetivo central de la investigación biomédica. El descubrimiento de diversos factores con capacidad angiogénica, entre los cuales destaca el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), ha proporcionado una herramienta de interpretación extraordinariamente poderosa.

El control de la vascularización reside en el endotelio, órgano diana de los procesos de crecimiento vascular. Al proceso de formación de nuevos vasos a partir de células endoteliales (CE) de vasos preexistentes se le denomina angiogénesis. Ésta ocurre a través de una serie de pasos secuenciales e incluyen: disolución de la membrana basal, migración, proliferación y formación de estructuras tubulares capilares (1). En adultos, la angiogénesis no es un proceso frecuente, salvo en la reparación de heridas. Por el contrario, ocurre angiogénesis en un número considerable de situaciones patológicas (2,3).

La posibilidad de que la angiogénesis pueda inhibirse o favorecerse farmacológicamente, en particular en caso de crecimiento de tumores metastásicos (4,5) o, en el extremo opuesto, en cicatrización de heridas (6), ha promovido la investigación de los mecanismos básicos por los cuales las CE son estimuladas hacia la angiogénesis. El desarrollo de los nuevos vasos es un proceso de regulación compleja, e involucra a factores de crecimiento y a hormonas, que actúan como reguladores positivos o negativos. El balance relativo entre éstos determinará si ocurre o no angiogénesis y la intensidad de la misma. Por sus características particulares, destaca entre ellos el VEGF, que posee un efecto prácticamente exclusivo sobre el crecimiento endotelial, afectando sólo marginalmente a otros tipos celulares (7).

El VEGF es una glicoproteína homodímera de 45 KDa, básica y con dominios de unión a heparina. Las distintas isoformas de VEGF se logran por "splicing" alternativo del ARNm, que codifica proteínas de 121, 165, 189 y 206 aa (8); éstas difieren en su capacidad de unión a heparina. La isoforma 165 es la más abundante y es producida por diversos tipos celulares (9). En la regulación de la expresión del gen de VEGF, la tensión de oxígeno tiene un papel crítico. En una gran cantidad de tipos celulares, la expresión del ARNm de VEGF se induce rápida

INTRODUCTION

Establishing the mechanisms regulating normal and pathological tissue vascularization is a central objective of biomedical research. The discovery of various factors with angiogenic capacity, including most remarkably the vascular endothelial growth factor (VEGF), has provided an extraordinarily powerful interpretation tool.

The control of vascularization is located in the endothelium, a target organ of vascular growth processes. The process of new vessel formation from endothelial cells (EC) of pre-existing vessels is called angiogenesis. This occurs through a series of sequential steps, including: dissolution of the basal membrane, migration, proliferation, and formation of capillary tubular structures(1). In adults, angiogenesis is not a common process, except for the case of wound repairs. On the contrary, angiogenesis occurs in a substantial number of medical conditions (2,3).

The possibility that angiogenesis can be inhibited or enhanced pharmacologically, particularly in case of metastatic tumor growth (4,5) or, in the opposite case, in wound healing,(6) has promoted the investigation of the basic mechanisms whereby ECs are stimulated toward angiogenesis. The development of the new vessels is a complex regulation process, involving growth factors and hormones, that act as positive or negative regulators. The relative balance between these will determine the occurrence or not of angiogenesis and its intensity. For its specific characteristics, to be noted is the VEGF, which has a virtually exclusive effect on endothelial growth, affecting only marginally other cell types (7).

VEGF is a basic homodimer glycoprotein of 45 KDa, with heparin binding domains. The different isoforms of VEGF are achieved by alternative splicing of the mRNA that codes 121, 165, 189, and 206 aa proteins (8); these differ in their capacity for binding to heparin. Isoform 165 is the most abundant and is produced by various cell types (9). In the regulation of the VEGF gene expression, oxygen tension plays a critical role. In a high number of cell types, the VEGF mRNA expression is induced readily and reversibly if exposed to a low partial oxygen pressure (10). Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) has been identified as the main regulator of

y reversiblemente si se exponen a una baja presión parcial de oxígeno (10). El factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) se ha identificado como el regulador principal de la respuesta transcripcional en condiciones de baja concentración de O₂ (11).

Los VEGF se unen, al menos, a tres receptores de tipo tirosina quinasa: los receptores VEGFR1 (Flt-1) y VEGFR2 (KDR/Flk-1) (12) se expresan principalmente en las CE. El receptor VEGFR3 (Flt-4) se expresa exclusivamente en vasos linfáticos y está implicado en la regulación de la linfangiogénesis. Los VEGFR1 y VEGFR2 tienen diferentes propiedades de transducción de señal. El VEGFR1 presenta una respuesta débil de fosforilación y aparentemente media señales que regulan la migración celular mediante la reorganización de la actina (13). La interacción del VEGF con el VEGFR2 es imprescindible para inducir una gran cantidad de respuestas biológicas en las CE: activando proliferación, migración, supervivencia y reorganización de la actina en CE (14). Los nuevos abordajes terapéuticos de angiogénesis están encaminados a disminuir o aumentar las concentraciones tisulares de VEGF, según se quiera interferir o favorecer, respectivamente, la vascularización.

La angiogénesis es un fenómeno clave en el crecimiento y la diseminación tumoral. El desarrollo rápido y desordenado de las células neoplásicas requiere un crecimiento vascular acorde con sus altas necesidades metabólicas. Los tumores promueven angiogénesis secretando distintos factores que estimulan la migración, proliferación, actividad proteolítica y morfogénesis capilar (3). El VEGF es el principal factor angiogénico secretado por el tumor (2). En la literatura hay datos experimentales *in vitro* donde se comprueba el efecto de células tumorales, o su medio condicionado, sobre un endotelio en crecimiento, en estado subconfluyente (15,16), observándose en todos ellos un aumento de la proliferación de CE. Sin embargo, no se dispone de datos relativos a efectos tumorales sobre un endotelio confluyente y quiescente, tal como se encuentra «*in vivo*». Algunos aspectos que quedan aún por definir son cómo activa la célula tumoral a la endotelial, qué cambios se producen para activarla, y cómo afecta este medio tumoral a la supervivencia endotelial. Asimismo, se ignora en gran medida qué vías de señalización se hallan involucradas en la activación del endotelio por

the transcriptional response under conditions of low O₂ concentration (11).

VEGFs bind at least to three receptor like tyrosine kinase: the VEGFR1 (Flt-1) and VEGFR2 receptors (KDR/Flk-1)(12) are expressed mainly in the ECs. The VEGFR3 receptor (Flt-4) is expressed solely in lymphatic vessels and is involved in the regulation of lymphangiogenesis. VEGFR1 and VEGFR2 have different signal transduction properties. VEGFR1 shows a weak phosphorylation response, apparently mediating signals that regulate cell migration through reorganization of actin (13). The interaction of VEGF with VEGFR2 is essential to induce a large amount of biological responses in ECs: activating proliferation, migration, survival, and reorganization of actin in the EC (14). The new therapeutic approaches of angiogenesis are aimed at reducing or increasing VEGF tissue concentrations, for interfering or enhancing, respectively, vascularization.

Angiogenesis is a key phenomenon in tumor growth and dissemination. The fast, disorganized development of neoplastic cells requires a vascular growth consistent with its high metabolic needs. Tumors promote angiogenesis secreting different factors that stimulate migration, proliferation, proteolytic activity, and capillary morphogenesis.(3) VEGF is the main angiogenic factor secreted by the tumor.(2) The literature provides experimental data *in vitro* that show the effect of tumor cells, or its conditioned medium, on a growing endothelium, in a subconfluent state (15,16), observing in all of them an increased EC proliferation. However, no data are available on tumor effects on a confluent, quiescent endothelium, as it is found *in vivo*. Some issues still to be outlined are how the tumor cell activates the endothelial cells, which changes occur to activate it, and how this tumor medium affects endothelial survival. Furthermore, the signal pathways involved in the activation of the endothelium by the tumors are largely unknown.

MATERIAL AND METHODS

Obtaining, primary culture, and characterization of endothelial cells (EC)

ECs were isolated from bovine aorta through changes in the method of Jaffe et al (17,18). After

parte de los tumores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención, cultivo primario y caracterización de células endoteliales (CE)

Las CE se aislaron de aorta bovina según modificaciones del método de Jaffe y col (17,18). Después del primer pase se utilizó un medio selectivo para CE: medio esencial mínimo conteniendo D-Valina (MEM D-Val), suplementado con 20% de SFB. Las CE se caracterizaron como endoteliales por su fenotipo y la apariencia en «pavimento» e inmunocitoquímica para factor VIII von Willebrand (FVIII), así como para CD31.

Cultivo de MG63 y preparación de medio condicionado (MC)

Estas células se seleccionaron por su capacidad de expresar VEGF basalmente, expresión que se acentúa en condiciones de hipoxia (19). Para preparar el MC, una vez llegadas las células a confluencia, se puso medio sin suero (24h), se recolectó y se filtró. Este medio se añadió a las CE sin realizar modificaciones. En distintas ocasiones se utilizó en el MC+CoCl₂ (10 µM) (Sigma), que reproduce los efectos de la hipoxia (20,21).

Citometría de flujo

Se realizó por el método de Nicoletti y cols modificado (22). Una vez recogidas las CE, se centrifugaron (900 rpm, 10 min), se retiró el sobrenadante y se resuspendieron en Ioduro de Propidio (IP, 0,1 mg/ml), Igepal 0,05% y RNasa (20 µg/ml) (Sigma). La fluorescencia del IP se analizó en un citómetro FACSCalibur mediante el programa CELLQuest (BD Transduction Laboratories). Se registró el porcentaje de células por debajo del pico G0/G1 como células muertas.

Ensayos de invasión en Matrigel.

Estos ensayos se realizaron en cámaras de invasión con Matrigel para 24 pocillos, (Invasion chamber, Growth factor reduced MatrigelTM Matriz, BD Transduction Laboratories). Las CE se sembraron (1x10⁵ cel/pocillo) sobre el Matrigel. A las 48h los

the first run, a selective medium was used for EC: minimum essential medium containing D-valine (MEM D-Val), supplemented with 20% FBS. The ECs were characterized as endothelial for their phenotype and their immunocytochemical appearance in «pavement» for von Willebrand factor VIII (FVIII), as well as for CD31.

Culture of MG63 and preparation of conditioned medium (CM)

These cells were selected for their ability to express VEGF at baseline, an expression increasing under hypoxia conditions (19). In order to prepare the CM, once the cells have reached confluence, a serum-free medium was used (24h), collected and filtered. This medium was added to the ECs without making any changes. On different occasions it was used in CM+CoCl₂ (10µM) (Sigma), that reproduces the effects of hypoxia (20,21).

Flow cytometry

It was performed by the modified Nicoletti et al. method (22). Once the ECs were collected, they were centrifuged (900 rpm, 10 min), the supernatant was removed and they were resuspended in propidium iodide (PI, 0.1 mg/mL), 0.05% Igepal, and RNase (20µg/mL) (Sigma). The fluorescence of PI was analyzed in a FACSCalibur cytometer through the CELLQuest software (BD Transduction Laboratories). The percentage of cells below the G0/G1 peak was recorded as dead cells.

Invasion tests in Matrigel

These tests were carried out in invasion chambers with Matrigel for 24 wells (Invasion chamber, Growth factor reduced MatrigelTM Matrix, BD Transduction Laboratories). The ECs were seeded (1x10⁵ cel/well) on the Matrigel. At 48 h the wells were washed with DPBS, the Matrigel was removed, the cells were fixed with glutaraldehyde and stained in a 1% violet glass aqueous solution. Once the wells were dry, the membrane was cut. They were placed in a holder as support, and the cells were counted in fields

pocillos se lavaron con DPBS, se retiró el Matrigel, las células se fijaron con glutaraldehído y se tiñeron en una solución acuosa de cristal violeta al 1%. Una vez secos los pocillos, se recortó la membrana. Se colocaron en un porta como soporte y las células se contaron en campos acotados por rejillas.

Ensayos de acondicionamiento celular: Resiembra

Las CE confluentes se trataron con los distintos medios durante 24h. Las CE se tripsinizaron y sembraron (1×10^4 cel/cm²) en placas de 24 pocillos, dejándolas crecer en medio al 1% SFB. La eficacia de la resiembra se examinó contando las CE a las 48-72h.

Reacción en cadena de la polimerasa Transcriptasa inversa (RT-PCR)

Los análisis de expresión de VEGF y sus receptores VEGFR1 y VEGFR2 se realizaron por técnicas de RT-PCR. Las muestras se procesaron según protocolos establecidos por nuestro laboratorio (18,23). Los productos resultantes de la RT-PCR se verificaron mediante secuenciación automática (373 DNA Sequencer, Applied Biosystems).

Actividad de caspasa 3

La actividad de la caspasa 3 se cuantificó empleando el Kit comercial específico: AC-DEVD-AMC caspase 3 (CPP32) de Pharmigen (BD Transduction Laboratories).

Cuantificación de VEGF en MC de MG63

Las concentraciones de VEGF en el MC se cuantificaron usando un ELISA comercial específico: Accucyte Human VEGF (Cytimmune Sciences Inc), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis de VEGF y rutas de señalización por Western Blot

Las proteínas se extrajeron y se procesaron según protocolos establecidos por nuestro Laboratorio (18,23). El análisis de la fosforilación de p44/p42-MAPK y Akt (Ser 473) así como sus respectivos

delimitados por rejillas.

Cell preconditioning tests: Reseeding

Confluent ECs were treated with the different media for 24 h. The ECs were trypsinized and reseeded (1×10^4 cell/cm²) on 24-well dishes, and were led to growing in 1% FBS medium. The efficacy of reseeding was examined counting the ECs at 48-72 h.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

The analyses of expression of VEGF and its VEGFR1 and VEGFR2 receptors were carried out by RT-PCR techniques. The samples were processed according to protocols established by our laboratory (18,23). The products resulting of the RT-PCR were confirmed through automatic sequencing (373 DNA Sequencer, Applied Biosystems).

Caspase 3 activity

The activity of caspase 3 was quantified using a specific commercial kit: AC-DEVD-AMC caspase 3 (CPP32) of Pharmigen (BD Transduction Laboratories).

VEGF quantitation in MG63 CM

The concentrations of VEGF in the CM were quantified using a specific commercial ELISA: Accucyte Human VEGF (Cytimmune Sciences Inc), in accordance with the manufacturer's instructions.

Analysis of VEGF and signaling pathways by Western Blot

The proteins were extracted and processed according to protocols established by our laboratory (18,23). The analysis of p44/p42-MAPK and Akt phosphorylation (Ser 473) as well as its respective burden controls (p44/p42-MAPK and total Akt) was developed following the manufacturer's instructions (Cell Signaling Technology). The inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), LY294002 (20 μ M, Sigma) and

controles de carga (p44/p42-MAPK y Akt total) se desarrolló siguiendo las instrucciones del fabricante (Cell Signaling Technology). Los inhibidores de fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K), LY294002 (20 μ M, Sigma) y de MAPKK, PD98059 (50 μ M, Calbiochem) se usaron añadiéndolos 45 minutos antes de poner los distintos medios. Para cuantificar la expresión del VEGF autocrino, se empleó un AcM frente a VEGF (Sigma); como control de carga, se empleó un AcM frente alfa-tubulina (Sigma).

Inmunocitoquímica para CD31 y FVIII

Las CE se cultivaron hasta confluencia y se fijaron con Merckofix®. Una vez en confluencia, se incubaron con MEM D-Val al 0,5% de SFB, MC y MC-Cl₂Co durante 7 días, y se fijaron igualmente con Merckofix® (Merck). La inmunocitoquímica se realizó con un kit comercial específico («EnVision™ System», DakoCytomation). En casos concretos, se realizó conteo de condensaciones cromatínicas/nucleolos y de estructuras de capilares celulares. La relación núcleo-citosol se calculó por planimetría lineal, sobre las mismas fotografías. Ocasionalmente, se utilizaron tinciones celulares como la de hematoxilina-eosina de Carazzi.

Datos estadísticos

Los datos se expresaron como media \pm error estándar. Cada valor corresponde a un mínimo de 5 experimentos hechos por triplicado. Las comparaciones se hicieron mediante el test de ANOVA o la prueba de “t” de Student, emparejada o no emparejada. Se utilizaron las pruebas de Fisher y Scheffé para comparaciones múltiples para determinar el nivel de significación de p, que se consideró significativo a valores < 0,05. Las comparaciones entre cada condición de los experimentos y con el basal se hicieron con estos cálculos. Todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 13.0 Windows (SPSS Inc.).

RESULTADOS

1. El medio condicionado (MC) de células tumorales MG63 contiene VEGF y ejerce efectos protectores sobre las CE

Las distintas muestras de medio se midieron a las

of MAPKK, PD98059 (50 μ M, Calbiochem) were used adding them 45 minutes before placing the different media. In order to quantify the expression of autocrine VEGF, an Mab to VEGF (Sigma) was used; as loading control, Mab to tubulin (Sigma) was used.

Immunocytochemistry for CD31 and FVIII

ECs were cultured to confluence and were fixed with Merckofix®. Once in confluence, they were incubated with MEM D-Val at 0.5% FBS, CM and CM-Cl₂Co for 7 days, and were also fixed with Merckofix® (Merck). Immunocytochemistry was carried out with a specific commercial kit (“EnVisionSystem”, DakoCytomation). In specific cases, count of chromatin condensations/nucleoli and of capillary cell structures was carried out. The nucleus-cytosol ratio was calculated by linear planimetry, on the same pictures. Occasionally, cell staining was used, such as Carazzi’s hematoxylin-eosin.

Statistical data

The data were expressed as mean \pm standard error. Each value corresponds to a minimum of 5 tests performed in triplicate. The comparisons were made through the ANOVA test or the paired or non-paired Student’s t test. Fisher and Scheffé tests for multiple comparisons were used to establish the p significance level, that was considered significant at values < 0.05. The comparisons between each test condition and to the baseline were made with these calculations. All the calculations were carried out with the SPSS statistical package 13.0 for Windows (SPSS Inc.).

RESULTS

1. The conditioned media (CM) of tumor cells MG63 contain VEGF and perform protective effects on ECs

The different samples of medium were measured at 24 h of adding MG63 cells, in the case of the CM, or of EC in case of the control medium. Neither in the fresh medium (FM), nor in the EC control medium VEGF was identified, while in

24h de añadirse a las células MG63, en el caso del MC, o de CE en caso del medio control. Ni en el medio fresco (MF), ni el medio control utilizado de CE se detectó VEGF, mientras que en MC tumoral, el VEGF fue de $13,5 \pm 1,2$ ng/ml; esta cantidad se incrementó cuando la incubación se realizó en presencia de CoCl_2 ($10 \mu\text{M}$): $26,8 \pm 1,5$ ng/ml ($p < 0,01$ con respecto a MC sin CoCl_2). El MC con CoCl_2 sólo se empleó en algunos casos, como método para asemejar las condiciones existentes en las áreas hipóxicas del tumor.

Seguidamente, expusimos a las CE al MC y medimos la supervivencia celular por citometría de flujo. La exposición de CE a MC aumentaba la supervivencia endotelial de forma evidente: con MC hubo solamente un $5,6 \pm 1,2\%$ de muerte celular, frente a un $33,5 \pm 6,3\%$ que aparece en CE con medio sin suero (MF) ($p < 0,01$). La protección es cercana a la que se alcanza con 20% de FBS, donde sólo un $1,8 \pm 1,2\%$ corresponde a células muertas.

2. El MC de células tumorales induce cambios fenotípicos en el endotelio confluyente, mediados en una proporción significativa por VEGF

El MC de MG63, especialmente cuando se añade CoCl_2 , induce cambios fenotípicos significativos en el endotelio, como se muestran en la figura 1. Estos cambios son consistentes con un estado activado del endotelio, pudiendo observarse un aumento en el número de acúmulos de cromatina/nucleolos (CE + MC de MG63: $5,3 \pm 0,7$ cromatina/nucleolos/cel frente a CE + sin MC: $3,4 \pm 0,4$ cromatina/nucleolos/cel, $p < 0,01$) y un aumento del tamaño del núcleo respecto al citosol (Relación núcleo/citosol MF: $0,48 \pm 0,14$; MC- CoCl_2 : $0,68 \pm 0,13^*$; MC- CoCl_2 + AcM anti-VEGF: $0,40 \pm 0,12$ (* $p < 0,01$)).

También se detectaron cambios llamativos en la organización de las CE en la superficie de cultivo (Figura 1A, 1C). Así, las CE incubadas con MC y más aún con MC- CoCl_2 , desarrollaron vacuolizaciones que ocuparon la totalidad del espacio citosólico. Estas vacuolizaciones son morfológicamente idénticas a las estructuras capilares unicelulares encontradas en angiomas malignos. Coincidentemente, se desarrollaron espacios acelulares, idénticos a estructuras vasculares primitivas en distribución bidimensional (figura 1C).

Como cambios significativos encontramos que la

tumor CM the VEGF was 13.5 ± 1.2 ng/mL; this quantity increased when the incubation was performed in the presence of CoCl_2 ($10 \mu\text{M}$): 26.8 ± 1.5 ng/mL ($p < 0.01$ with respect to CM without CoCl_2). The CM with CoCl_2 was only used in some cases, as a method for mimicking the conditions existing in hypoxic areas of the tumor.

Next, we exposed the CM to ECs and measured cell survival by flow cytometry. The exposure of ECs to CM clearly increased endothelial survival: with CM only $5.6 \pm 1.2\%$ of cell death occurred, in contrast to $33.5 \pm 6.3\%$ appearing in ECs with serum-free medium (FM) ($p < 0.01$). The protection is close to that reached with 20% FBS, where only $1.8 \pm 1.2\%$ corresponds to dead cells.

2. The tumor cell CM induces phenotype changes in the confluent endothelium, largely mediated by VEGF

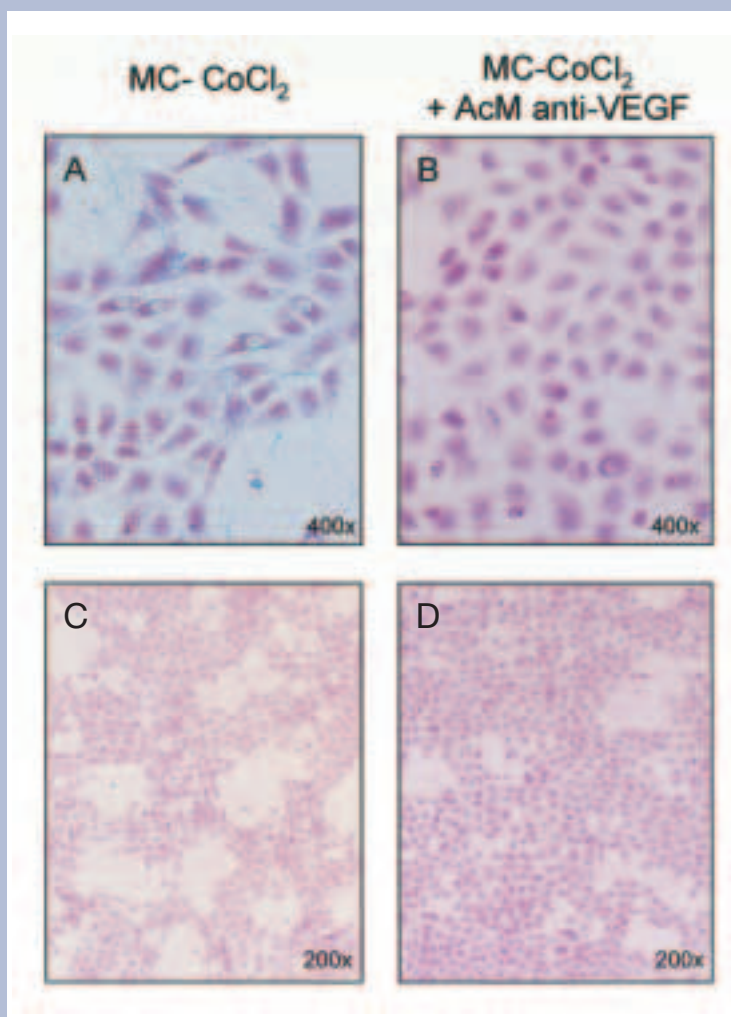
The MG63-CM, particularly when CoCl_2 is added, induces significant phenotype changes in the endothelium, as shown in Figure 1. These changes are consistent with an activated endothelial state, and an increase can be seen in the number of chromatin/nucleoli accumulations (EC + CM of MG63: $5,3 \pm 0,7$ chromatin/nucleoli/cell vs EC + without CM: $3,4 \pm 0,4$ chromatin/nucleoli/cell, $p < 0,01$) and an increase in the size of the nucleus as compared to cytosol (Nucleus/cytosol ratio FM: $0,48 \pm 0,14$; CM- CoCl_2 : $0,68 \pm 0,13^*$; CM- CoCl_2 -VEGF + AcM: $0,40 \pm 0,12$ (* $p < 0,01$)).

Marked changes were also seen in the organization of ECs in the culture surface (Figure 1A, 1C). Thus, the EC incubated with CM and even more so with CM- CoCl_2 developed vacuolations completely occupying the cytosol space. These vacuolations are morphologically identical to the single-cell capillary structures found in malignant angiomas. Coincidentally, cell-free spaces appeared, that were identical to primitive vascular structures in bidimensional distribution (Figure 1C).

The significant changes found were that the incubation in presence of anti-VEGF Mab in CM- CoCl_2 led to partial inhibition of the formation of cell-free spaces (Figure 1D) and a virtually complete inhibition of single-cell capillary structures (Figure 1B). Quantitatively, the number

Figura 1. Cambios fenotípicos en CE tratadas con MC-CoCl₂: A y C: CE tratadas con MC-CoCl₂; B y D: CE tratadas con MC-CoCl₂ + AcM anti-VEGF. Las dos figuras superiores muestran un detalle de las imágenes (400x), observándose las vacuolas citoplásmicas (A, flechas) (capilarización unicelular). Las dos figuras inferiores muestran un campo más general (200x) y se observan los espacios acelulares que aparecen en una capa confluyente de CE después de los tratamientos indicados. Como puede observarse, el AcM anti-VEGF disminuye drásticamente el nº de CE vacuoladas de aspecto capilar y reduce el tamaño de las áreas acelulares. Además, estas células presentan acusados signos de desvitalización, con picnosis nuclear (B).

Figure 1. Phenotype changes in ECs treated with CM-CoCl₂: A and C: ECs treated with CM-CoCl₂; B and D: ECs treated with CM-CoCl₂ + Mab anti-VEGF. The above two figures show a detail of the images (400x), observing the cytoplasmic vacuoles (A, arrows) (single-cell capillarization). The two figures below show a more general field (200x), and the cell-free spaces are seen to appear in a confluent layer of EC after the prescribed treatments. As seen, the anti-VEGF Mab decreases markedly the number of vacuolated ECs of capillary appearance and reduces the size of cell-free areas. Furthermore, these cells show marked signals of devitalization, with nuclear pyknosis (B).



incubación en presencia de el AcM anti-VEGF en el MC-CoCl₂ determinó una inhibición parcial de la formación de espacios acelulares (figura 1D) y una inhibición prácticamente completa de estructuras capilares unicelulares (figura 1B). Cuantitativamente, el nº de CE con formación de vacuolas citoplásmicas en CE tratadas con MC-CoCl₂ (capilares unicelulares) fue del 25% (n = 394 células), frente al 0,5% de CE con vacuolas cuando se trataron con MC-CoCl₂ + AcM anti-VEGF.

3. El MC de MG63 favorece la invasividad en matrices y el rendimiento en cultivo de las CE, por medio de mecanismos que involucran al VEGF

Para examinar la posibilidad de cambios en la

of ECs with formation of cytoplasmic vacuoles in ECs treated with CM-CoCl₂ (single-cell capillaries) was 25% (n = 394 cells) vs 0.5% ECs with vacuoles when treated with CM-CoCl₂ + Mab anti-VEGF.

3. The CM of MG63 enhances invasiveness in matrixes and performance in culture of ECs, by means of mechanisms involving the VEGF

In order to examine the possibility of changes in the invasiveness of the endothelium suggested by the endothelial activation described, we used a Matrigel matrix system. As shown in Table I, the ECs incubated in conventional FM crossed the Matrigel at very low amounts (possibly for not

invasividad del endotelio sugerida por la activación endotelial descrita, utilizamos un sistema de matriz de Matrigel. Tal como se ve en la tabla I, las CE incubadas en MF convencional atravesaron el Matrigel en cantidades mínimas (posiblemente al no poseer suficiente actividad de proteasas de matriz). En cambio, la incubación de CE con MC indujo la migración de estas células a través del Matrigel; esta capacidad se redujo significativamente en presencia del AcM anti-VEGF y es total al bloquear el VEGFR2 con el AcM 3.83 (tabla I).

Para saber si el estado de activación continuaba aún después de quitar el estímulo, utilizamos CE confluentes tratadas con MC durante 24h, que posteriormente se tripsinizaron y sembraron. En estas condiciones, observamos que el pretratamiento con MC-MG63 induce en el endotelio una ventaja de crecimiento en la resiembra, aún mas evidente en el caso de MC-CoCl₂ (tabla II).

4. El bloqueo de VEGF o de su receptor VEGFR2 transforma el efecto del MC de MG63 de citoprotector a tóxico.

Basados en estos resultados, analizamos si el VEGF presente en el MC-MG63, era o no crítico para su efecto protector. Estos experimentos indi-

having sufficient matrix protease activity). On the other hand, the incubation of ECs with CM induced the migration of these cells through the Matrigel; this capacity decreased significantly in presence of anti-VEGF Mab and is total upon blocking the VEGFR2 with Mab 3.83 (Table I).

In order to establish if the state of activation still continued after removing the stimulus, we used ECs treated with CM for 24h, that were subsequently trypsinized and reseeded. Under these conditions, we observed that pretreatment with CM-MG63 induces in the endothelium a growth advantage in reseeded, even more clear in the case of CM-CoCl₂ (Table II).

4. The blockage of VEGF or of its receptor VEGFR2 transforms the effect of MG63-CM from cytoprotective to toxic.

Based on these results, we analyzed if the VEGF present in the MG63-CM was or not critical for its protective effect. These tests indicated that the inhibition of the effect of the VEGF through specific antibodies to VEGF or its receptor VEGFR2 not only blocks the protective effect, but also shows a latent cytotoxic effect of the tumor CM (Figure 2), that is not present in the FM. A similar event can be seen in the reseeded tests, where

TABLA I. Medidas de activación de CE por penetración en matrigel
TABLE I. Measures of EC activation by penetration in Matrigel

	Nº de CE/campo	Nº of ECs/field
MF	12 ± 5	FM
MF + IgG	14 ± 3	FM + IgG
MF + AcM anti-VEGF	17 ± 6	FM + Mab anti-VEGF
MC	237 ± 36*	CM
MC + IgG	220 ± 42	CM + IgG
MC + AcM anti-VEGF	102 ± 15**	CM + Mab anti-VEGF
MF + 3.83	15 ± 5	FM + 3.83
MC + 3.83	16 ± 5***	CM + 3.83

Las CE se contaron a las 48h de poner los distintos agonistas. MF: medio fresco sin suero. MC: medio condicionado de MG63. AcM anti-VEGF: 1 µg/ml, 3.83 (anti-VEGFR2): 0,5 µg/ml. IgG no específica. *p < 0,001 con respecto al basal. **p < 0,01 con respecto al MC sólo. ***p < 0,001 con respecto al MC sólo.

The ECs were counted at 48 h of placing the different agonists. FM: fresh medium without serum. CM: conditioned medium of MG63. anti-VEGF Mab: 1 µg/ml, 3.83 (anti-VEGFR2): 0.5 µg/ml. Nonspecific IgG. *p < 0.001 vs baseline. ** p < 0.01 vs the CM alone. ***p < 0.001 vs the CM alone.

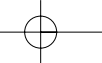


TABLA II. Ventaja de crecimiento de las CE por preconditionamiento celular
TABLE II. Growth advantage of ECs by cell preconditioning

	48h (x10 ⁴ cel/cm ²)	72h (x10 ⁴ cel/cm ²)	
MF	4,6 ± 0,8 (46%)	6,4 ± 0,7 (64%)	FM
MF+ IgG	4,5 ± 0,3 (45%)	6,2 ± 1,1 (62%)	FM+ IgG
MF + AcM anti-VEGF	4,8 ± 0,7 (48%)	6,7 ± 0,8 (67%)	FM + Mab anti-VEGF
MC	9,9 ± 1,3 (99%)**	6,5 ± 1,5 (65%)	CM
MC + AcM anti-VEGF	5,0 ± 1,2 (50%)	3,6 ± 1,3 (36%)*	CM + Mab anti-VEGF
MC- CoCl ₂	10,6 ± 0,8 (106%)*	8,4 ± 1,2 (84%)**	CM - CoCl ₂
MC- CoCl ₂ + AcM anti-VEGF	5,0 ± 1,1 (50%)*	5,0 ± 1,1 (50%)*	CM- CoCl ₂ + Mab anti-VEGF

Contaje celular realizado a 48h y 72h [no se midió a las 24h, debido a que las CE requieren 24h para adherirse suficientemente a la placa]. Entre paréntesis se muestran los rendimientos (%) de la resiembra. MF: medio fresco sin suero. MC: medio condicionado de MG63; MC-CoCl₂: MC con CoCl₂ (10 µM); AcM anti-VEGF: 1µg/ml. *p < 0,05 y **p < 0,01 con respecto al MF, respectivamente. NOTA: Para detalles de las condiciones de cultivo, ver Materiales y Métodos.

Cell count carried out at 48 h and 72 h [not measured at 24 h, since the ECs require 24 h to attach sufficiently to the plaque]. In brackets, the yields (%) of reseeding. FM: fresh medium without serum. CM: conditioned medium of MG63; CM-CoCl₂: CM with CoCl₂ (10 µM); Anti-VEGF Mab: 1µg/ml. *p < 0.05 and **p < 0.01 for the FM, respectively. NOTE: For details on the culture conditions, see Material and Methods.

caron que la inhibición del efecto del VEGF mediante anticuerpos específicos frente a VEGF o su receptor VEGFR2 no solo bloquea el efecto protector, sino que revela un efecto citotóxico latente del MC tumoral (Figura 2), que no está presente en el MF. Un fenómeno similar puede observarse en los experimentos de resiembra, en los que el uso de anticuerpo anti-VEGF indujo una disminución por debajo del basal a las 72h (tabla II), tanto en células tratadas con

the use of anti-VEGF antibody induced a reduction below baseline at 72 h (Table II), both in cells treated with CM and with CM-CoCl₂.

5. The CM of MG63 promotes the expression of VEGFR2 but inhibits that of autocrine endothelial VEGF

The above findings supported the significance of

Figura 2. Análisis de la muerte celular (48h) mediante citometría de flujo: En todos los casos, excepto el control con 20% de SFB, el medio no tenía SFB. MF: medio control sin SFB; MC: medio condicionado de MG63; AcM anti-VEGF se utilizó a 1 µg/ml y el AcM 3.83 (anti VEGFR2) a 0,5 µg/ml. * p < 0,01 con respecto al 20% de SFB; ** p < 0,05 con respecto al MF sin suero.

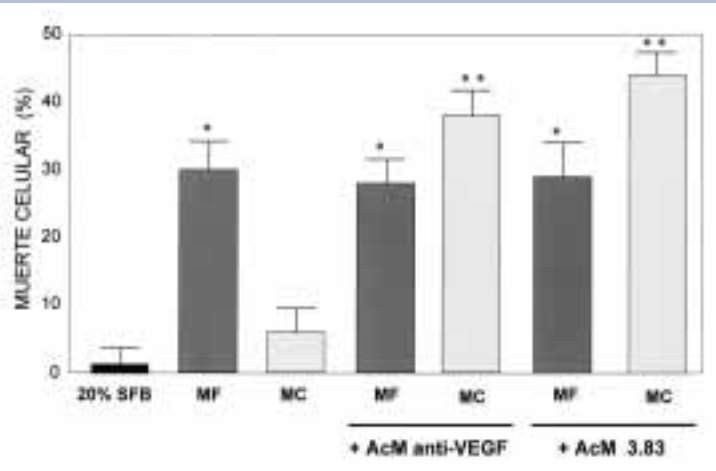


Figure 2. Analysis of cell death (48 h) through flow cytometry: In all cases, except for the control with 20% FBS, the medium did not contain FBS. FM: control medium without FBS; CM: conditioned medium of MG63; anti-VEGF Mab was used at 1 µg/ml and Mab 3.83 (anti VEGFR2) at 0.5 µg/ml. * p < 0.01 for 20% FBS; ** p < 0.05 for serum-free FM.

Figura 3. Análisis de la expresión de VEGF. 3A. Expresión del ARNm de VEGF a distintos tiempos medidos por RT-PCR: En la figura se indican, en la parte superior, los distintos tiempos en los que se recogió el ARNm. Los signos (-) y (+) indican respectivamente el uso de medio sin SFB o el de MC sobre las CE. La utilización del AcM anti-VEGF y del AcM anti-VEGFR2 (AcM 3.83) quedan igualmente indicados en los correspondientes casos. Como control interno se utilizó β -actina. 3B. Proteína de VEGF medida por Western blot a 24h y 48h: En la figura los signos (-) y (+) indican respectivamente el uso de medio sin SFB (-) o el de MC (+) sobre las CE. La adición de VEGF exógeno al MF (10 ng/ml) se encuentra también indicada en la figura. Como control interno se utilizó α -tubulina.

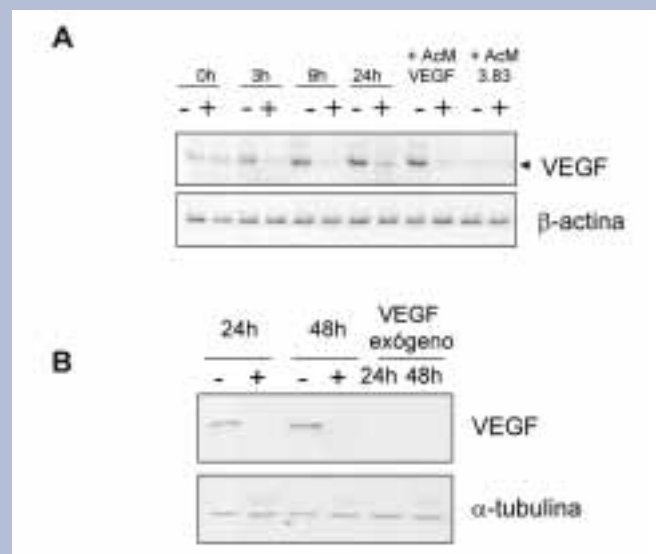


Figure 3. Analysis of VEGF expression. 3A. Expression of VEGF mRNA at different times measured by RT-PCR: The figure shows, in the upper part, the different times at which the mRNA was collected. The signs (-) and (+) indicate respectively the use of medium without FBS or that of CM on the ECs. The use of anti-VEGF Mab and of anti-VEGFR2 Mab (Mab 3.83) are also indicated in the relevant cases. The house-keeping control used was β -actin.

3B. VEGF protein measured by Western blot at 24 h and 48 h: In the figure below the signs (-) and (+) indicate respectively the use of medium without FBS (-) or that of CM (+) on the EC. The addition of exogenous VEGF to FM (10 ng/mL) is also indicated in the figure. The house-keeping control used was α -tubulin.

MC como con MC-CoCl₂.

5. El MC de MG63 promueve la expresión de VEGFR2 pero inhibe la de VEGF autocrino endotelial.

Los hallazgos anteriores sustentaban la importancia del VEGF en los mecanismos observados. Basándose en los datos acerca del papel del VEGF autocrino obtenidos en las primeras series experimentales, se analizaron las regulaciones recíprocas entre el VEGF de origen tumoral contenido en el MC de MG63 y el VEGF autocrino de las CE.

La expresión de ARNm de VEGF por parte de las CE se estimula durante la incubación en ausencia de SFB (figura 3A); sin embargo, este estímulo se inhibió completamente en presencia del MC. Se obtuvo un resultado idéntico al examinar la producción

VEGF in the observed mechanisms. Based on the data about the role of autocrine VEGF obtained in the first experimental series, the reciprocal regulations between VEGF of tumor origin contained in the CM of MG63 and the autocrine VEGF of the ECs were analyzed.

The expression of VEGF mRNA by EC is stimulated during the incubation in the absence of FBS (Figure 3A); however, this stimulus was completely inhibited in presence of the CM. An identical result was obtained examining the production of VEGF protein, through Western blot (Figure 3B).

In order to clarify the mechanism whereby the endothelial expression of VEGF mRNA is inhibited in the presence of tumor CM, the possibility that the expression of endogenous VEGF could be inhibited by the exogenous found in the CM was considered.

Figura 4. Expresión de VEGFR1 y VEGFR2 a distintos tiempos por RT-PCR: En la figura se indican en la parte superior, los distintos tiempos en los que se recogió el ARNm. Los signos (-) y (+) indican respectivamente el uso de medio sin SFB o el de MC sobre las CE. La utilización del AcM anti-VEGF y de AcM anti-VEGFR2 (AcM 3.83) quedan igualmente indicados en los correspondientes casos. Como control interno se utilizó β -actina.

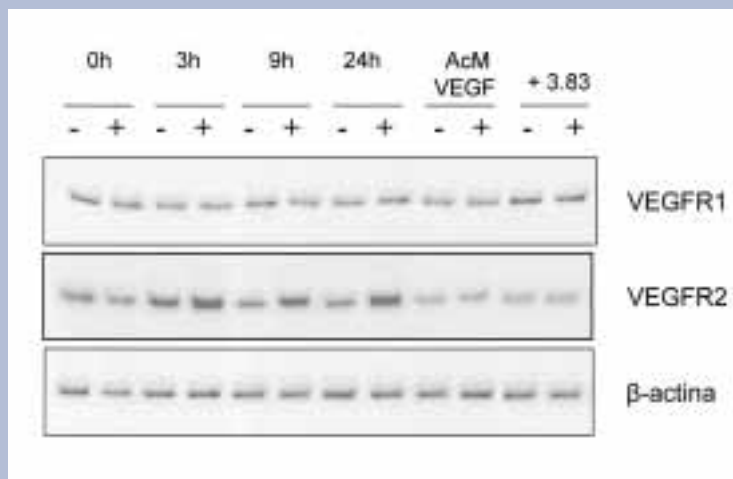


Figure 4. VEGFR1 and VEGFR2 expression at different times by RT-PCR: The figure shows in the upper part the different times at which mRNA was collected. The signs (-) and (+) indicate respectively the use of medium without FBS or that of CM on the ECS. The use of anti-VEGF Mab and of anti-VEGFR2 Mab (AcM 3.83) is also indicated in the relevant cases. The house-keeping control used was β -actin.

de la proteína de VEGF, por Western blot (figura 3B).

Para clarificar el mecanismo por el que se inhibe la expresión endotelial de ARNm de VEGF en presencia de MC tumoral, se pensó en la posibilidad de que la expresión del VEGF endógeno se pudiera inhibir por el exógeno que se encontraba en el MC. En este sentido, observamos que el VEGF exógeno agregado al MF provocaba la pérdida de expresión de VEGF endógeno en las CE a nivel de proteína (figura 3B), avalando la existencia de una inhibición de un VEGF sobre la expresión del otro. Sin embargo, al utilizar el AcM anti-VEGF se observó que la producción de VEGF endógeno continuó inhibida y lo mismo ocurrió al añadir el AcM bloqueante anti VEGFR2 (figura 3A). A continuación estudiamos qué efectos podía tener sobre los receptores de VEGF, VEGFR1 y VEGFR2. En los experimentos realizados a distintas horas, pudimos ver un aumento de expresión de ARNm de VEGFR2 a 3, 6, 9 y 24 h cuando las CE eran incubadas con MC. La presencia del VEGF exógeno tiene un papel relevante en este incremento de VEGFR2, ya que si las CE se trataban con AcM anti-VEGF, la expresión de VEGFR2 disminuía significativamente (figura 4). Por el contrario, no se detectó ningún efecto sobre la expresión del

With this regard, we observed that the exogenous VEGF aggregated to the FM caused the loss of expression of endogenous VEGF in the ECs in the proteins (Figure 3B), which supports the existence of an inhibition of a VEGF on the expression of the other. However, when the anti-VEGF Mab was used, it was shown that the production of endogenous VEGF continued to be inhibited and the same occurred upon adding the anti-VEGFR2 blocking Mab (Figure 3A). Below we study the potential effects on the VEGF, VEGFR1 and VEGFR2 receptors. In the tests carried out at different hours, an increase was seen in VEGFR2 mRNA expression at 3, 6, 9, and 24 h when the ECs were incubated with CM. The presence of exogenous VEGF plays a relevant role in this VEGFR2 increase, since if the ECs were treated with anti-VEGF Mab, VEGFR2 expression decreased significantly (Figure 4). On the contrary, no effect was identified on the expression of the VEGFR1 receptor mRNA (Figure 4).

6. Analysis of mechanisms induced by MG63-CM

In order to analyze the mechanisms involved in

ARNm del receptor VEGFR1 (figura 4).

6. Análisis de mecanismos inducidos por el MC de MG63

Para analizar los mecanismos implicados en la protección endotelial inducida por el MC, estudiamos los niveles de activación de las rutas de supervivencia endoteliales. El MC provocó la activación de la ruta de supervivencia PI3K/Akt y de la ruta de proliferación de las MAPK de manera tiempo-dependiente (Figura 5), como se ve por el incremento de la formas fosforiladas mediante Western blot con anticuerpos específicos. Como era de esperar, esta activación fue inhibida en presencia de inhibidores específicos de estas rutas, como son LY294002 (20 μ M) y PD98059 (50 μ M) respectivamente.

Asimismo, la exposición de las CE al MC indujo una disminución en la actividad de la caspasa 3 (caspasa ejecutora de apoptosis) a partir de las 6 horas de exposición. Esta disminución fue significativa transcurridas 24h desde la incorporación del MC (Figura 6). En cualquier caso, la actividad estaba disminuida significativamente cuando las células se encontraban en su medio de crecimiento con 20% de SFB.

DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en este estudio aclaran los

the endothelial protection induced by the CM, we studied the levels of activation of the endothelial survival pathways. The CM led to the activation of the PI3K/Akt survival pathway and the proliferation pathway of MAPK on a time-dependent basis (Figure 5), as shown by the increase of phosphorhyllated forms through Western blot with specific antibodies. As expected, this activation was inhibited in the presence of specific inhibitors of these pathways, such as LY294002 (20 μ M) and PD98059 (50 μ M) respectively.

Furthermore, the exposure of ECs to the CM induced a reduction in the activity of caspase 3 (caspase executing apoptosis) starting from 6 hours after exposure. This reduction was significant after 24 h from the addition of the CM (Figure 6). In any case, the activity decreased significantly when the cells were in their growth media with 20% FBS.

DISCUSSION

The data obtained in this study clarify the previously unknown issues of the performance of the EC in the tumor media, concerning EC activation. There are multiple and varied *in vitro* studies with tumor CM.(24,25) However, our

Figura 5. Análisis de rutas de supervivencia activadas por MC mediante Western blot de p-AKT y p-MAPK: El MC induce la fosforilación tanto de AKT como MAPK. El inhibidor de PI3K LY294002 (20 μ M) y el de MAPKK PD98059 (50 μ M) se usaron para inhibir dicha fosforilación. AKT y MAPK total se usaron como control de carga.

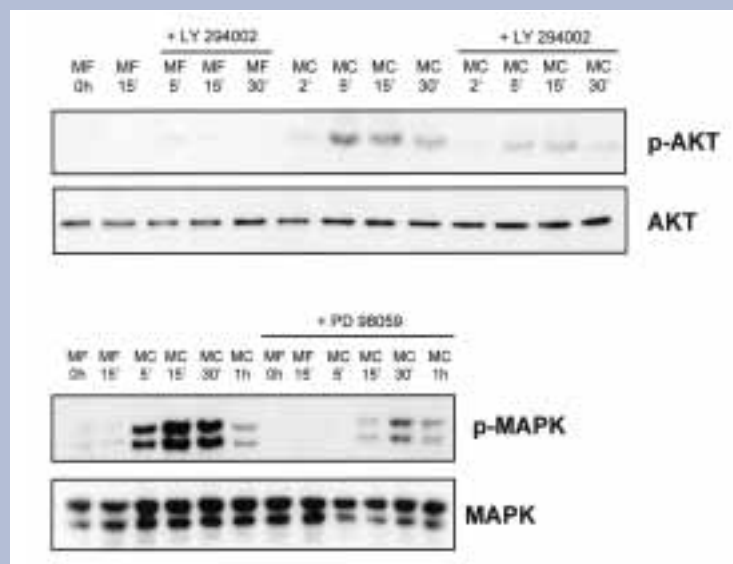


Figure 5. Analysis of survival pathways activated by CM through Western blot of p-AKT and p-MAPK: The CM induces the phosphorylation of both AKT and MAPK. The inhibitor of PI3K LY294002 (20 μ M) and that of MAPKK PD98059 (50 μ M) were used to inhibit this phosphorylation. AKT and total MAPK were used as loading control .

Figura 6. Análisis de actividad apoptótica inducida por MC: Medida de la actividad relativa de caspasa 3 en CE a distintos tiempos en presencia de medio condicionado de MG63 (MC), medio sin suero (MF), o medio con 20% SFB. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al MF.

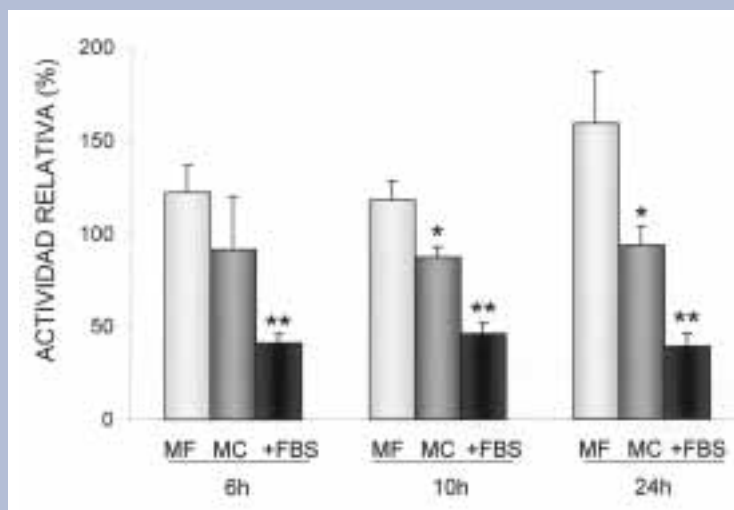


Figure 6. Analysis of apoptotic activity induced by CM: Measurement of the relative activity of caspase 3 in ECs at different times in the presence of conditioned medium of MG63 (CM), serum-free medium (FM), or medium with 20% FBS. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ for FM.

aspectos previamente desconocidos del comportamiento de la CE en el microambiente tumoral, referidos a la activación de la CE. Los estudios in vitro con MC tumorales son muy numerosos y variados (24,25). Sin embargo, nuestro trabajo difiere de los realizados, en que se han utilizado CE en estado confluyente. Los experimentos con MC se realizaron como modelo experimental de una situación biológica en la que un endotelio sano, en confluencia y quiescente desde el punto de vista del ciclo celular, se ve expuesto a la acción masiva de factores de crecimiento, y en particular, de VEGF.

En primera instancia, nuestros resultados confirmaron el efecto protector que produce el MC de células tumorales sobre las CE similar a la observada si se le añade a un medio normal SFB, del mismo modo que encontramos en la literatura. Seguidamente, se realizó un hallazgo previamente no descrito en la literatura; al eliminar el efecto del VEGF del MC con AcM bloqueantes, este efecto protector, no solamente desaparecía, sino que además el MC tumoral pasaba a ser mucho más dañino para el endotelio. Empleando AcM anti-VEGFR2, este efecto tóxico era similar al producido por el AcM anti-VEGF, e incluso más acusado, lo que indicaba que el efecto protector es debido al VEGF y que además se produce vía receptor VEGFR2. El que el efecto tóxico sea aún mayor que con el AcM anti-VEGF, puede ser debido a la presencia de otras moléculas relacionadas a VEGF, como son VEGF C y VEGF D, que también se

study differs from others performed in that confluent EC has been used. The studies with CM were carried out as experimental model of a biological status where a healthy endothelium, in confluence and quiescence from the standpoint of the cell cycle, is exposed to the massive action of growth factors, and particularly of VEGF.

First of all, our results confirmed the protective effect caused by the CM of tumor cells on the EC, similar to that seen when adding FBS to a normal medium, as reported in the literature. Then, we obtained a finding not previously described in the literature; when removing the effect of the CM VEGF with blocking Mab, this protective effect not only disappeared but also the tumor CM became much more harmful for the endothelium. Using anti-VEGFR2 Mab, this toxic effect was similar to that caused by the anti-VEGF Mab, and even more marked, indicating that the protective effect is due to VEGF and that it also occurs through the VEGFR2 receptor. The fact that the toxic effect is even greater than with anti-VEGF Mab can be due to the presence of other molecules related to VEGF, such as VEGF C and VEGF D, also binding to the same receptor(26). In any case, our results establish that, in the absence of VEGF, the tumor media is toxic for the endothelium. These data corresponded in part to the findings of Benjamín et al.,(27) who reported that tumor vessels of

unen al mismo receptor (26). En cualquier caso, nuestros resultados establecen que, en ausencia de VEGF, el medio tumoral resulta tóxico para el endotelio. Estos datos se corresponden en parte con los hallazgos de Benjamín y col (27), quienes observaron que vasos tumorales de estructura inmadura (sólo endoteliales) se atrofian al antagonizar VEGF. El aspecto enteramente nuevo de nuestros resultados radica en el desenmascaramiento de la actividad citotóxica endotelial del medio tumoral.

Se sabe que las CE pueden llegar a formar estructuras semejantes a capilares, con un soporte adecuado, como por ejemplo el Matrigel (28). Sin embargo no está descrito como “*in vitro*”, en placas bidimensionales, y sin ningún tipo de matriz añadido, un medio que ha estado en contacto con células tumorales, más aún en condiciones de hipoxia, puede crear las condiciones adecuadas para que estas CE pongan en marcha toda la maquinaria necesaria para formar unas estructuras similares a capilares y lagunas vasculares.

El tumor, en condiciones de hipoxia, es capaz de secretar todos los factores necesarios para favorecer la angiogénesis, proteasas para romper la matriz, una gran cantidad de factores angiogénicos que atraen (29) y hacen migrar a las CE hacia el estímulo, proliferar y permitir que el tumor crezca y se disemine (30).

Las estructuras observadas, vacuolas o “agujeros” aparecidos en las CE tratadas con MC-CoCl₂, se corresponden con las encontradas en el seno de tejidos tumorales o matrices tridimensionales (31,32). La práctica desaparición de estas vacuolas en presencia del AcM anti-VEGF, sugiere que éste es el factor clave en la capilarización.

Nuestros experimentos muestran como en presencia del MC tumoral las CE se vuelven invasivas y atraviesan el Matrigel, un fenómeno que no ocurre en condiciones normales. Sin embargo si introducimos en el MC el AcM anti-VEGF o el AcM anti-VEGFR2, encontramos que esta capacidad queda prácticamente abolida, con lo que pierden por tanto la capacidad de invasividad. Esta capacidad de penetración del Matrigel y su dependencia de VEGF deben ponerse en relación con la capacidad de este factor de activar metaloproteasas (33).

En la literatura encontramos que tratamientos antiangiogénicos, con anticuerpos que bloquean al VEGFR2, inhiben el desarrollo de tumores y metástasis de distintos tipos, y en general son bien tolerados (34,35). En estos protocolos se asume que al inhibir la

immature structure (only endothelial) atrophy when antagonizing VEGF. The complete novelty of our results is that endothelial cytotoxic activity of the tumor media is unmasked.

It is known that the ECs can eventually form structures similar to capillaries, with an adequate support, for instance the Matrigel (28). However, it is not described as *in vitro*, on bidimensional plaques, and with no added type of matrix. A medium that has been in contact with tumor cells, even more under conditions of hypoxia, it can create the adequate conditions for these ECs to implement the whole necessary machinery for forming structures similar to capillaries and vascular lakes.

The tumor, under conditions of hypoxia, can secrete all the necessary factors in order to enhance angiogenesis, proteases to break the matrix, a high amount of angiogenic factors that attract (29) and lead to migrating the ECs to the stimulus, to proliferate and to allow for tumor growth and dissemination (30).

The observed structures, vacuoles or “holes” appeared in the ECs treated with MC-CoCl₂, corresponded to those found inside tumoral tissues or three-dimensional matrices.(31,32) The virtual disappearance of these vacuoles in the presence of the anti-VEGF Mab suggests that this is the key factor in capillarization.

Our tests show that, in the presence of tumor CM, the ECs become invasive and cross the Matrigel, which does not occur under normal conditions. However, if we add to the CM the anti-VEGF Mab or the anti-VEGFR2 Mab, we find that this capacity is virtually abolished, thus losing their invasiveness. This Matrigel penetrability and its dependence on VEGF should be related to the ability of this factor to activate metalloproteases (33).

In the literature we found that antiangiogenic treatments, with antibodies blocking VEGFR2, inhibit the development of tumors and metastasis of different types, and are generally well tolerated (34,35). In these protocols it is assumed that upon inhibiting the proliferation of the ECs, there is less progression of the tumor and its metastatic capacity decreases, but there are no studies that show that a blocking anti-VEGF Mab or an Mab vs VEGFR2 can block the ability to

proliferación de las CE, hay menos progresión del tumor y se produce una disminución en su capacidad metastásica, pero no hay estudios, donde podamos ver que un AcM anti-VEGF bloqueante o un AcM frente a VEGFR2 pueda interferir en la capacidad de atravesar esta matriz y por tanto de disminuir potencialmente su capacidad metastásica.

Otro hecho original y de potencial importancia, fue que el MC disminuía la expresión basal de VEGF autocrino. En condiciones normales, las CE no expresan VEGF autocrino, posiblemente debido a que se encuentran rodeadas por otras, como los pericitos y el músculo liso vascular, que sí lo expresan y “protegen” a las CE a través de él. En nuestro caso, podríamos comparar al MC, donde se encuentra VEGF, con el VEGF que el endotelio pueda recibir de las células circundantes. En los vasos tumorales, esta situación cambia, los vasos están formados sólo por CE y no existen (o hay pocos) pericitos, de forma que si retiramos el VEGF del MC (VEGF exógeno o paracrino), utilizando el AcM anti-VEGF, al estar inhibida la producción de VEGF autocrino aparece el daño celular. Estos resultados aportan, por lo tanto, información de valor práctico a la hora de estimar la importancia funcional del VEGF autocrino. En cuanto al mecanismo de la citada inhibición, si bien el VEGF exógeno agregado al medio fresco fue capaz de inhibir la expresión de VEGF autocrino, la inhibición de éste por parte del MC demostró ser más compleja y, probablemente dependiente de otros factores contenidos en el MC, al no bloquearse la inhibición de la expresión de VEGF autocrino por parte del MC en presencia del AcM anti-VEGF o el AcM VEGFR2.

El MC aumenta la expresión de VEGFR2, este hallazgo es compatible con datos de la literatura, en que se ha visto aumento de expresión de VEGFR2 en CE con distintas líneas tumorales (36,37). Los resultados con el MC tumoral indican que el VEGF contenido en este medio, incrementa la expresión de VEGFR2 de forma paracrina, y en unos tiempos llamativamente más rápidos que los descritos con VEGF exógeno aislado (38). Esto sugiere la existencia en el MC, de factores coadyuvantes de dicha expresión. Aunque los mecanismos aún no están aclarados. Así, nuestros resultados indican que el MC activa en las CE las dos rutas principales de supervivencia: PI3K/Akt y p44/p42-MAPK. Estas rutas están implicadas en la señal intracelular de diferentes factores de crecimientos,

cross this matrix and accordingly of reducing potentially its metastatic capability.

Another original, potentially significant fact is that the CM decreased the baseline expression of autocrine VEGF. Under normal conditions, the ECs do not express autocrine VEGF, possibly as they are surrounded by others, including pericytes and vascular smooth muscle, that do express it and protect the ECs through it. In our case, we could compare the CM, where VEGF is located, to the VEGF that the endothelium can receive from the surrounding cells. In the tumor vessels, this changes; the vessels are only formed by EC and there are not (or there are few) pericytes, so that removing the VEGF from the CM (exogenous or paracrine VEGF), using anti-VEGF Mab, as the production of autocrine VEGF is inhibited cell damage occurs. Consequently, these results provide information of practical value when estimating the functional importance of autocrine VEGF. With regard to the mechanism of the above inhibition, though exogenous VEGF added to the fresh media was above to inhibit the expression of autocrine VEGF, its inhibition by the CM proved to be more complex, and probably dependent on other factors contained in the CM, as the inhibition of autocrine VEGF expression was not blocked by the CM in presence of anti-VEGF AcM or VEGFR2 Mab.

The CM increases VEGFR2 expression, and this finding is consistent with literature data, where an increased VEGFR2 expression has been seen in EC with different tumor lines.(36,37) The results with the tumor CM indicate that the VEGF contained in this medium increases the paracrine VEGFR2 expression, at times remarkably faster than those described with isolated exogenous VEGF.(38) This suggests the existence in the CM of coadjuvant factors of this expression, though the mechanisms have not been elucidated yet. Therefore, our results indicate that the CM activates in the ECs the main two survival pathways: PI3K/Akt and p44/p42-MAPK. These pathways are involved in the intracellular signal of different growth factors, including the VEGF.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was performed through a Research grant from the FUNDACIÓN MAPFRE.

entre ellos el VEGF.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado mediante una Ayuda de Investigación de la FUNDACION MAPFRE.

Los autores quieren agradecer al Dr. Pedro Esbrit (Fundación Jiménez Díaz, Laboratorio de Metabolismo mineral y óseo) por la cesión de la línea tumoral MG63, a la Dra. Guadalupe Renedo (Fundación Jiménez Díaz, Servicio de Anatomía Patológica), por su ayuda en las técnicas de inmunocitoquímica, y al Dr. Daniel Pereira (ImClone INC), por el anticuerpo frente a VEGFR2, clon 3.83.

The authors want to thank to Dr. Pedro Esbrit (Fundación Jiménez Díaz, Laboratory of Mineral and Bone Metabolism) for transferring the tumor line MG63, to Dr. Guadalupe Renedo (Fundación Jiménez Díaz, Pathology Department) for her assistance in the immunocytochemistry techniques, and to Dr. Daniel Pereira (ImClone INC) for the antibody to VEGFR2, clone 3.83.

Bibliografía/References

1. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
2. Carmeliet P, Jain R K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
3. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
4. Saariisto A, Karpanen T, Alitalo K. Mechanisms of angiogenesis and their use in the inhibition of tumor growth and metastasis. *Oncogene* 2000; 19: 6122-6129.
5. Liu W, Ahmad S A, Reinmuth N, Shahenn R M, Jung Y D, Fan F, Ellis L M. Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis* 2000; 5: 323-328.
6. Tonnesen M G, Feng X, Clark R A. Angiogenesis in wound healing. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000; 5: 40-46.
7. Ferrara N. VEGF: an update on biological and therapeutic aspects. *Curr Opin Biotechnol* 2000; 11: 617-624.
8. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes J C, Abraham J A. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947-11954.
9. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280: C1358-C1366.
10. Minchenko A, Bauer T, Salceda S, Caro J. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 1994; 71: 374-379.
11. Wang G L, Semenza G L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; 270: 1230-1237.
12. Terman B, Khandke L, Dougher-Vermazan M, Maglione D, Lassam N J, Gospodarowicz D, Persico M G, Bohlen P, Eisinger M. VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor. *Growth Factors* 1994; 11: 187-195.
13. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin C H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1994; 269: 26988-26995.
14. Ortega N, Hutchings H, Plouet J. Signal relays in the VEGF system. *Front Biosci* 1999; 4: D141-D152.
15. Goto F, Goto K, Weindel K, Folkman J. Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 1993; 69: 508-517.
16. Keck P J, Hauser S D, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly D T. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989; 246: 1309-1312.
17. Jaffe E A, Nachman R L, Becker C G, Minick C R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973; 52: 2745-2756.
18. Castilla M A, Arroyo M V, Aceituno E, Aragoncillo P, Gonzalez-Pacheco F R, Texeiro E, Bragado R, Caramelo C. Disruption of cadherin-related junctions triggers autocrine expression of vascular endothelial growth factor in bovine aortic endothelial cells: effects on cell proliferation and death resistance. *Circ Res* 1999; 85: 1132-1138.
19. Akeno N, Czyzyk-Krzeska M F, Gross TS, Clemens TL. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor gene transcription in human osteoblast-like cells through the hypoxia-inducible factor-2alpha. *Endocrinology* 2001; 142: 959-962.
20. Sultana C, Shen Y, Johnson C, Kalra V K. Cobalt chloride-induced signaling in endothelium leading to the augmented adherence of sickle red blood cells and transendothelial migration of monocyte-like HL-60 cells is blocked by PAF-receptor antagonist. *J Cell Physiol* 1999; 179: 67-78.
21. Dachs G U, Tozer G M. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1649-1660.
22. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci M C, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; 139: 271-279.

23. Álvarez Arroyo M V, Castilla M A, González Pacheco F R, Tan D, Riesgo A, Casado S, Caramelo C. Role of vascular endothelial growth factor on erythropoietin-related endothelial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1998-2004.
24. Luo J, Guo P, Matsuda K, Truong N, Lee A, Chun C, Cheng S Y, Korc M. Pancreatic cancer cell-derived vascular endothelial growth factor is biologically active in vitro and enhances tumorigenicity in vivo. *Int J Cancer* 2001; 92: 361-369.
25. Liu W, Daviz D W, Ramirez K, Mcconkey D J, Ellis L M. Endothelial cell apoptosis is inhibited by a soluble factor secreted by human colon cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 92: 26-30.
26. Detmar M. Tumor angiogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000; 5: 20-23.
27. Benjamín L E, Keshet E. Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 8761-8766.
28. Grant D S, Tashiro K, Segui-Real B, Yamada Y, Martin G R, Kleinman H K. Two different laminin domains mediate the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures in vitro. *Cell* 1989; 58: 933-943.
29. Okamoto H, Ohigashi H, Nakamori S, Ishikawa O, Imaoka S, Mukai M, Kusama T, Fujii H, Matsumoto Y, Akedo H. Reciprocal functions of liver tumor cells and endothelial cells. Involvement of endothelial cell migration and tumor cell proliferation at a primary site in distant metastasis. *Eur Surg Res* 2000; 32: 374-379.
30. D'Angelo G, Ladoux A, Frelin C. Hypoxia-induced transcriptional activation of vascular endothelial growth factor is inhibited by serum. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 334-338.
31. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, Mclean J W, Thurston G, Roberge S, Jain R K, McDonald D M. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 2000; 156: 1363-1380.
32. Yang S, Graham J, Kahn J W, Schwartz E A, Gerritsen M E. Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *Am J Pathol* 1999; 155: 887-895.
33. Connolly D T, Heuvelman D M, Nelson R, Olander J V, Eppley B L, Delfino J J, Siegel N R, Leimgruber R M, Feder J. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 1989; 84: 1470-1478.
34. McMahon G. VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis. *Oncologist* 2000; 5 Suppl 1: 3-10.
35. Zhu Z, Witte L. Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor. *Invest New Drugs* 1999; 17: 195-212.
36. Ortega N, Jonca F, Vincent S, Favard C, Ruchoux M M, Plouet J. Systemic activation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/flk-1 selectively triggers endothelial cells with an angiogenic phenotype. *Am J Pathol* 1997; 151: 1215-1224.
37. Murota S I, Onodera M, Morita I. Regulation of angiogenesis by controlling VEGF receptor. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 902: 208-212.
38. Shen B Q, Lee D Y, Gerber H P, Keyt B A, Ferrara N, Zioncheck T F. Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J Biol Chem* 1998; 273: 29979-29985.

Mechanisms of endothelial cell protection by blockade of the JAK2 pathway

Fernando Neria,^{1*} Carlos Caramelo,^{1*} Héctor Peinado,² Francisco R. González-Pacheco,¹
Juan JP. Deudero,¹ Alain J. de Solís,¹ Ruth Fernández-Sánchez,¹
Silvia Peñate,¹ Amparo Cano,² and M^a Ángeles Castilla¹

¹Laboratorio de Nefrología-Hipertensión, Fundación Jiménez Díaz, Madrid; and

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols,”
Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma, Madrid, Spain

Submitted 27 October 2005; accepted in final form 6 October 2006

Neria F, Caramelo C, Peinado H, González-Pacheco FR, Deudero JJ, de Solís AJ, Fernández-Sánchez R, Peñate S, Cano A, and Ángeles Castilla M. Mechanisms of endothelial cell protection by blockade of the JAK2 pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1123–C1131, 2007. First published October 11, 2006; doi:10.1152/ajpcell.00548.2005.—Inhibition of the JAK2/STAT pathway has been implicated recently in cytoprotective mechanisms in both vascular smooth muscle cells and astrocytes. The advent of JAK2-specific inhibitors provides a practical tool for the study of this pathway in different cellular types. An interest in finding methods to improve endothelial cell (EC) resistance to injury led us to examine the effect of JAK2/STAT inhibition on EC protection. Furthermore, the signaling pathways involved in JAK2/STAT inhibition-related actions were examined. Our results reveal, for the first time, that blockade of JAK2 with the tyrosine kinase inhibitor AG490 strongly protects cultured EC against cell detachment-dependent death and serum deprivation and increases reseeding efficiency. Confirmation of the specificity of the effects of JAK2 inhibition was attained by finding protective effects on transfection with a dominant negative JAK2. Furthermore, AG490 blocked serum deprivation-induced phosphorylation of JAK2. In terms of mechanism, treatment with AG490 induces several relevant responses, both in monolayer and detached cells. These mechanisms include the following: 1) Increase and nuclear translocation of the active, dephosphorylated form of β -catenin. In functional terms, this translocation is transcriptionally active, and its protective effect is further supported by the stimulation of EC cytoprotection by transfectionally induced excess of β -catenin. 2) Increase of platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)/CD31 levels. 3) Increase in total and phosphorylated AKT. 4) Increase in phosphorylated glycogen synthase kinase (GSK)3 α / β . The present findings imply potential practical applications of JAK2 inhibition on EC. These applications affect not only EC in the monolayer but also circulating detached cells and involve mechanistic interactions not previously described.

JAK2/STAT; cytoprotection; anoikis; AG490

INDUCTION OF ENDOTHELIAL CELL (EC) resistance to injury is a critical issue in designing tools for vascular therapeutics. Endothelial preservation is important in an extremely ample array of conditions, extending from pathologies in which endothelial injury is the leading mechanism, e.g., malignant hypertension or hemolytic-uremic syndrome (HUS), to arterial hypertension or simply to mechanical endothelial damage as occurs during vascular interventional procedures. Remarkably, a new perspective of interest has been opened with the recognition of the

role of endothelial precursors in the repair of the endothelial layer (28).

Numerous studies have dealt with the subject of endothelial protection, basically employing growth factors and stimulating cytoprotective pathways, e.g., phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT, stress proteins, or MAP kinases (19). The Janus kinase/signal transducers and activators of the transcription (JAK/STAT) pathway transmits information received from extracellular peptide signals through transmembrane receptors directly to target gene promoters in the nucleus, therefore providing a mechanism for transcriptional regulation without identified second messengers. While signaling through the canonical JAK/STAT pathway has been extensively characterized in stimulated immune cells, emerging evidence indicates that STATs also mediate responses to forms of cellular stress as diverse as ischemia/reperfusion, endotoxin, ultraviolet light, or hyperosmolarity (9). Notwithstanding, data are less than homogeneous as to how JAK inhibition affects cell damage in different models of ischemic injury (10, 15, 20). At present, most of the information available on this subject comes from the field of cardiovascular medicine. In this regard, JAK/STAT signaling appears to have an important role in the development of the cardioprotected phenotype associated with ischemic preconditioning (15). On the other hand, double-edged effects have been reported in models of myocardial infarction, i.e., while JAK/STAT activation reduces apoptosis in the myocardial infarction border zone, JAK2/STAT inhibition by AG490 improves the increase of protein phosphatase-1 activity and decreases the levels of p16-phospholamban, which underlie myocardial dysfunction (10). Moreover, the inhibition of the JAK/STAT pathway may result in a significant reduction in the size of devitalized tissue and in the number of cardiomyocytes undergoing apoptosis (20). Furthermore, JAK2/STAT is involved in the anti-apoptotic effect of granulocyte colony-stimulating factor in severely ischemic myocardium and endothelium (13). Collectively, these data indicate that cellular stress activates STATs in ways that can be either detrimental or supportive of cell survival. Recently, a substantial, specific piece of information has been added, by demonstrating that JAK2 tyrosine kinase mediates oxidative stress-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells (27) and astrocytes (11). As a consequence, JAK2 inhibition induces cytoprotection against oxidative aggression. In the same line of evidence, oxidized low-density lipoproteins have been recently shown to induce, by means of lipid peroxidation products, tyrosine

* F. Neria and C. Caramelo contributed equally to this study.

Address for reprint requests and other correspondence: M^a Ángeles Castilla, Laboratorio de Nefrología-Hipertensión, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma, Avda. Reyes Católicos 2, 28040 Madrid, Spain.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

phosphorylation and activation of JAK2, STAT1, and STAT3, therefore providing support to consider JAK2 as an oxidative stress-activated kinase (21). The actual mechanisms involved in these effects have not been sufficiently characterized; furthermore, data on models with possible applications to vascular pathology need to be generated.

To the best of our knowledge, no information has been published regarding the putative role of the JAK2/STAT pathway in cytoprotective or cytotoxic mechanisms on EC. In this sense, two particularly important types of damage are growth factor deprivation and cell detachment-related death. The latter is mainly due to detachment-dependent apoptosis, a phenomenon that has been designated as anoikis. Anoikis is crucial in determining the death of adult EC losing adherence to the monolayer (12), and its inhibition can be attained in only a few conditions. In this regard, previous literature (18) and preliminary results from our laboratory (Castilla MA, unpublished observations) have shown that inhibition of the glycogen synthase kinase (GSK)3 β pathway increases the survival of EC against detachment-related cell death. In terms of mechanism, inhibition of GSK3 β with LiCl increases β -catenin and favors its nuclear translocation. In these circumstances, β -catenin acts as a survival factor against detachment-related cell death (26, 29). Also, it is known that GSK3 β is a regulator of EC proliferation and anoikis (18).

As a part of the interest of our laboratory on the study of endothelial protective mechanisms (4–6), the hypothesis was raised that JAK2/STAT inhibition may have relevant protective effects on cells permanently exposed to stress, of which EC are a paradigm. Preliminary evidence from our laboratory has shown that JAK2/STAT inhibition strongly protects EC against oxidative damage (24). However, no data are available to date on the effects of JAK2/STAT inhibition on other types of injury involving EC. The advent of highly specific JAK2/STAT inhibitors provides a useful tool for examining this pathway (1, 11, 30).

The present study was aimed to analyze the hypothesis that specific JAK2/STAT inhibition induces significant changes in EC viability and to identify the mechanisms involved. Specific attention was dedicated to the study of protection of EC against detachment-related death, i.e., anoikis. A set of mutually related mechanisms with known endothelial protective properties, namely, β -catenin levels and active β -catenin translocation, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) expression, AKT phosphorylation, and potential apoptotic activators and inhibitors were examined.

MATERIALS AND METHODS

EC Culture

Bovine aorta EC (BAEC) and human umbilical vein EC (HUVEC) were obtained, characterized, and cultured as described (3, 4), in accordance with the Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings of the American Physiological Society (6). BAEC were used as the primary experimental source, and HUVEC were employed for complementary confirmatory experiments.

EC Challenge

The use of confluent, monolayer, or detached conditions was a critical point of this investigation. Confluent EC were submitted to either serum deprivation or cell detachment and suspension culture. In

all cases, vehicle alone (DMSO <0.1%), AG490 (Calbiochem, Barcelona, Spain), a tyrosine kinase-blocking inhibitor of JAK2 (11, 22, 27) or its control, and the structurally related non-JAK/STAT inhibitor AG82 (Calbiochem, Barcelona, Spain) were added 45 min before the experimental maneuvers were performed. The Src family protein kinase inhibitor PP2 (10 μ mol/l, Calbiochem) was also used. Cell viability was assessed by lactate dehydrogenase release (LDH), as described (6). DNA fragmentation (DNA ladder) of EC in agarose gels was used for further characterization of the apoptotic changes, as described (16). Conventional hematoxylin and eosin staining was used to obtain cell images under the different treatments.

Detached Cell Survival and Reseeding Assays

For triggering detachment-related cell death, after pretreatment, BAEC were removed from the culture plates with trypsin-EDTA and resuspended in 1% FBS medium. This small amount of FBS was necessary to avoid additional damage due to serum starvation. Resuspended cells were seeded onto tissue culture plates coated with poly-2-hydroxyethyl methacrylate (Poly-HEMA) (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). An additional system was used as a comparative control in selected experiments, i.e., BAEC were seeded into a spinner flask (Integra Biosciences, Chur, Switzerland) coated with Sigmacote (Sigma-Aldrich). At the times indicated, BAEC were harvested and processed by flow cytometry, as described (6). Both treatments prevented cell adhesion and hence induced anoikis.

For reseeding assay, BAEC cultured in suspension were allowed to grow for 24 h onto Matrigel-coated plates (Matrigel; BD Transduction Laboratories, Madrid, Spain) as described (6). BAEC were fixed, stained with crystal violet, and microphotographed. Cells were counted on 10 randomly chosen high-power fields by two independent observers blinded for the type of specific experiment.

Studies on β -Catenin and PECAM-1

β -Catenin and PECAM-1 (also known as CD31) levels were assessed by Western blot on total and/or nuclear proteins, using specific antibodies (β -catenin, BD Transduction Laboratories; PECAM-1, R&D Systems, Minneapolis, MN). α -Tubulin was used as loading control as described (6).

Further assessment of β -catenin and PECAM-1 was performed by confocal immunofluorescence. For this purpose, cells grown on glass coverslips were fixed with Merckofix (Merck, Barcelona, Spain), permeabilized (0.2% Triton X-100, 15 min), and incubated in PBS with 1% bovine serum albumin. Slides were incubated overnight with the primary antibodies, washed (PBS, 5 min, 3 \times), and incubated with a specific secondary antibody coupled to FITC (Sigma-Aldrich). For visualization of nuclei, cells were incubated for 45 min with propidium iodide. Confocal images were obtained with a Confocal System TCS SP20 (Leica, Madrid, Spain). Image quantitation was done by means of the program Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Ten randomly selected high-power fields were used for each quantitation.

A β -catenin/TCF activity reporter assay was performed to assess β -catenin functionality. For transfections, cells grown to 60–80% confluence were transfected with 20 ng of pTK-Renilla (Promega, Madrid, Spain) and 200 ng of either pTOPFLASH (Top) or pFOPFLASH (Fop) containing multimerized wild-type and mutated Lef1/Tcf binding sites, respectively, fused to a luciferase reporter gene (a gift of H. Clevers; University Hospital, Utrecht, The Netherlands). Transfections (4-set duplicates, 6 h) were performed with lipofectamine (Gibco, Madrid, Spain). BAEC were treated in the presence/absence of AG490 for 24 h, and afterward, luciferase and Renilla activities were measured using the Dual Luciferase Reporter Kit (Promega). When needed, 400 ng of activator plasmid encoding a metabolically stabilized β -catenin S33Y (a gift of A. Ben Ze'ev; Weizmann Institute, Rehovot, Israel) were added as indicated. DNA quantities were normalized with empty pCI-neovector. To analyze

whether the increased β -catenin was active, additional experiments were performed employing a specific antibody against the active form of β -catenin, dephosphorylated on Ser⁴⁷ or Thr⁴¹ (Upstate, Lake Placid, NY).

Transient Transfections

Different plasmids were transfected in BAEC using a CaCl₂-based method. Briefly, BAEC were grown near confluence (80–90%). The optimal transfection was achieved at a CaCl₂-to-DNA ratio of 6 mmol/l to 10 μ g/ml, respectively; the CaCl₂-DNA complex was performed in HBS buffer [21 mmol/l HEPES, 0.14 mol/l NaCl, 5.5 mmol/l D(+)-glucose, 50 mmol/l KCl, 1.32 mol/l Na₂HPO₄ at pH 7.1]. The transfection mix remained for an additional 6 h; then, BAEC were washed with PBS ($\times 2$), and growth medium was added until confluence was reached (48 h). Cell challenge was performed as described above. To evaluate transfection efficiency, all assays were also transfected using pEGFP-N1 vector (BD). Transfection efficiency was $>50\%$ in all cases.

A wildtype form of JAK2 (pBOS-HAJAK2) and a kinase domain mutant of JAK2 (pBOS-HAdkJAK2) (a gift from Dr. Dwayne L. Barber, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canada) were used. For β -catenin transfection, a wildtype form of β -catenin in a pCINeo vector was used (a gift of A. Ben Ze'ev; Weizmann Institute, Rehovot, Israel). In all cases, an empty vector was employed as control.

Electrophoretic Mobility Shift Assay

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was employed to further ascertain the specificity of the effects of AG490. EMSA was performed using nuclear proteins (8 μ g) and different consensus oligonucleotides (dsDNA, 0.5 ng) labeled with [γ -³²P]dATP in binding buffer 1 \times . Poly(dI-dC) was included as a competitive DNA. After incubation, samples were separated by acrylamide-bisacrylamide gels. Dried gels were exposed to X-Omat films. Commercial oligonucleotides of STAT3 and TFII were used (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Vascular endothelial growth factor (VEGF, R&D Systems) was used as a positive control of STAT3 nuclear binding (31).

Analysis of Protective and Apoptotic Pathways

BAEC protective pathways were analyzed by Western blot, using rabbit polyclonal anti-Bax (Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-Bcl2 (BD Transduction Laboratories), rabbit polyclonal

anti-phospho-AKT (Ser⁴⁷³) and phospho-GSK3 α/β (Ser^{21/9}) and their respective loading controls, anti-AKT and anti-GSK3 β (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). Specific antibodies against JAK2 and phospho-JAK2 and against STAT1, STAT3, STAT5, and STAT6 and their respective phosphorylated forms and loading controls were also used (Cell Signaling Technology). Caspase-3 activity was assayed on confluent BAEC with caspase-3 fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC (BD Transduction Laboratories). Activity was expressed as the signal in a luminometer (exciting wavelength 380 nm, and emission wavelength 440 nm).

Statistics

Results are expressed as means \pm SE. Unless stated otherwise, each value corresponds to a minimum of five triplicate experiments. Comparisons were done by ANOVA or paired or unpaired Student's *t*-test, when appropriate. Fisher and Scheffé's tests for multiple comparisons were used to determine the *P* value, which was considered significant at <0.05 . The statistical analyses were performed with the Windows SPSS 10.0 package (SPSS, Chicago, IL).

RESULTS

For facilitating their visualization, results have been grouped in experiments involving either attached or detached EC.

Experiments on Monolayer, Attached EC

Endothelial cytoprotection by JAK/STAT inhibition. Treatment with the specific JAK2 inhibitor AG490 protected confluent monolayer BAEC against serum deprivation (Fig. 1). This effect was significant from the 10 μ mol/l concentration. A similar effect was obtained by incubating confluent HUVEC with AG490 (50 μ mol/l) (%relative cell death with respect to 100% control: $69.5 \pm 5.7\%$, $P < 0.02$). The 50 μ mol/l concentration was henceforth used for examining specific points.

A first, fundamental issue was to assess the specificity of the effect of AG490 on the JAK/STAT pathway in BAEC. Such specificity was supported by the results of several experiments:

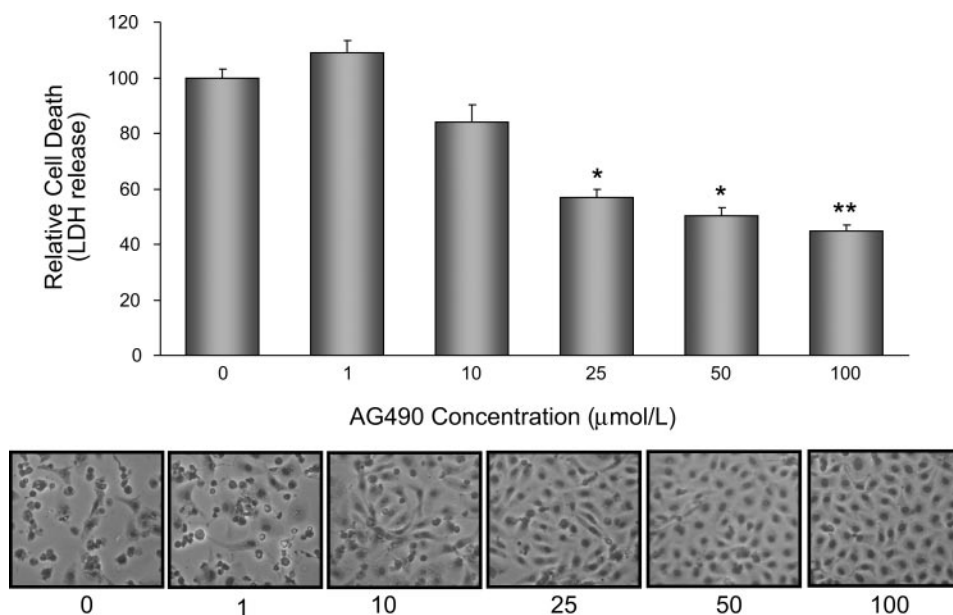


Fig. 1. Cytoprotective effect of AG490 on monolayer endothelial cells (EC). EC damage as induced by FBS depletion on confluent monolayer bovine aorta endothelial cells (BAEC) treated with fresh medium (FM) and FM + AG490 at different concentrations. Cell damage was assessed by lactate dehydrogenase (LDH) release at 48 h (top: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ with respect to the baseline, $n = 6$ triplicate experiments). FM alone was considered as 100% cell death. Phenotypic characteristics of BAEC processed in the same experimental conditions as above are shown at bottom (hematoxylin and eosin, $\times 400$). All wells were seeded with the same amount of cells. As can be seen, the integrity of the cell layer increases directly with AG490.

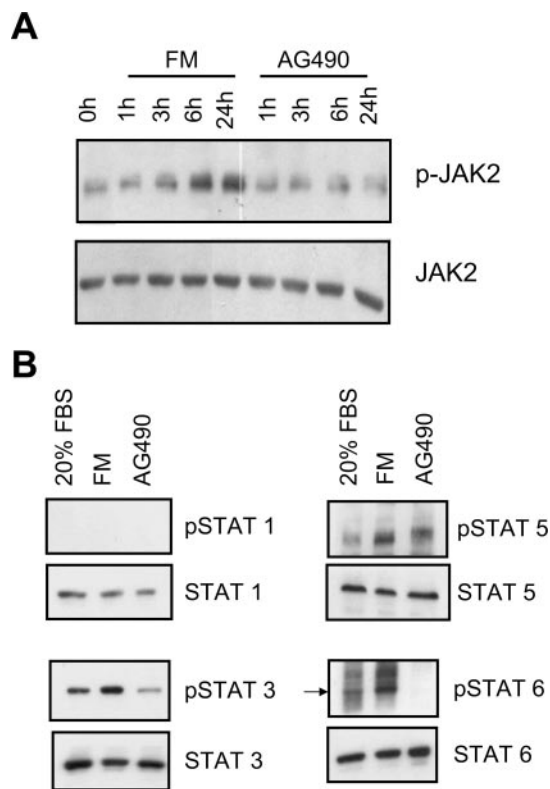


Fig. 2. AG490 effects on JAK2/STAT pathway. **A:** Western blot analysis of phosphorylated JAK2 from total lysates of confluent, monolayer EC, treated with FM or AG490 (50 μ mol/l) for times indicated. Total JAK2 was used as loading control. **B:** Western blot analysis of the phosphorylation state of different STAT proteins. Lysates were obtained from confluent monolayer EC treated with FM + 20% FBS, FM alone, or FM + AG490 (50 μ mol/l) for 24 h. Respective total STAT antibodies were used as loading control.

1) the inhibition of serum deprivation-induced JAK2 phosphorylation by AG490 (Fig. 2A); 2) the abolition of VEGF-induced STAT3 DNA binding (EMSA) (data not shown); 3) the inhibition of STAT3 and STAT6 phosphorylation by AG490 (Fig. 2B); and 4) the absence of EC protection by the structurally similar compound AG82, which is devoid of JAK2 inhibitory activity [relative cell death with respect to 100% in control cells: $97.5 \pm 2.1\%$, $P =$ not significant (NS) with respect to control cells]. These results were completed by experiments done in detached conditions (see below).

Changes in β -catenin and PECAM-1. On the basis of previous evidence (2, 29), the hypothesis was raised that treatment with AG490 could act on the levels and distribution of β -catenin. As shown in Fig. 3A, AG490 induced a marked increase in total and nuclear β -catenin. The increase of nuclear β -catenin persisted in BAEC pretreated with AG490 and lately cultured in suspension (see below). Additional experiments were done to more specifically assess whether the β -catenin accumulated in the nuclear extract corresponded to the active form. By means of an specific antibody, we found that treatment with AG490 induces nuclear accumulation of the active, dephosphorylated form of β -catenin (Fig. 3A, lane 3, left). When the β -catenin signal was further examined by confocal microscopy, treatment with media +20% FBS induced a marked increase of β -catenin, either at the intercellular junctions, cytosol, or nucleus (Fig. 4A). Treatment with AG490 induced

changes in β -catenin with a pattern similar to that of 20% FBS, including redistribution to the nucleus. BAEC treated with fresh medium (FM) alone had markedly less amounts of β -catenin, which was located only at the intercellular junctions (Fig. 4A, detail). By comparison, the GSK3 β inhibitor LiCl favored the localization of β -catenin to the nucleus as well as an increase of lesser magnitude in both cell junctions and cytoplasm (Fig. 4A).

At this point, the relevant question was to know whether the increase in nuclear β -catenin under the effect of AG490 was functional. As shown in Fig. 3B, AG490 induced a significant increase (1.95 ± 0.2 times, $P < 0.01$) of TOP/FOP activity, comparable with the levels obtained after β -catenin transient transfection (2.28 ± 0.2 times, $P < 0.01$). Additionally, the combination of β -catenin transfection with AG490 treatment

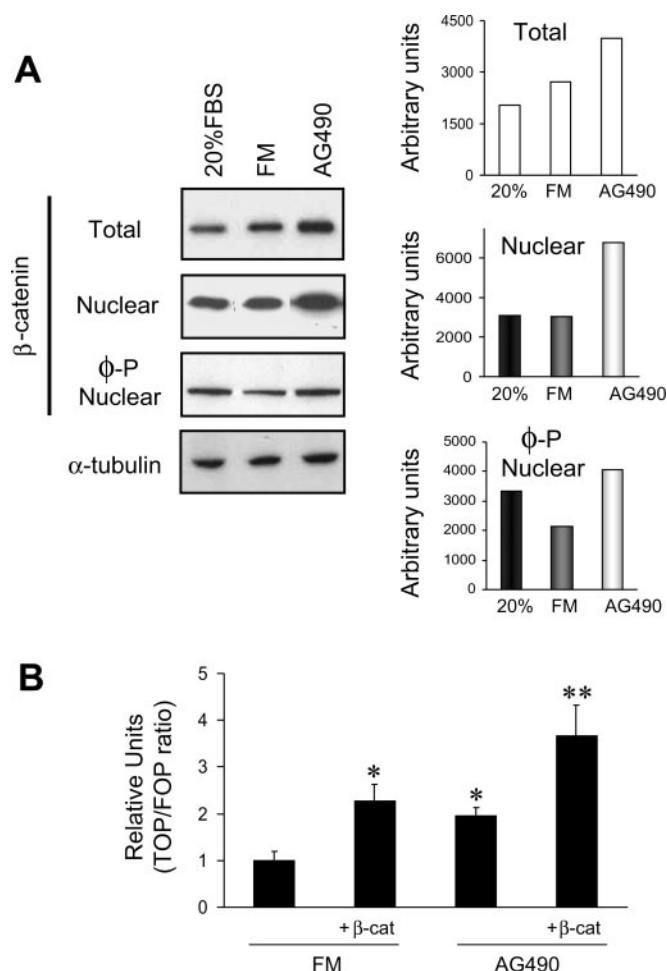


Fig. 3. Changes in total and nuclear β -catenin and β -catenin transcriptional activity under the influence of AG490. **A:** Western blot of nuclear and total β -catenin extracted from BAEC pretreated with FM + 20% FBS, FM alone, or FM + AG490 (50 μ mol/l) for 24 h. To further identify the activation of β -catenin, an antibody against active β -catenin, i.e., dephosphorylated on Ser³⁷ or Thr⁴¹, was also employed, and the intensity of the bands was quantified with respect to α -tubulin and displayed. α -Tubulin was used as loading control. **B:** β -catenin/Tcf activity assay using TOP/FOP luciferase reporter in EC treated with FM or FM + AG490 (50 μ mol/l). Bars denoted as + β -cat indicate cotransfection with a plasmid with the β -catenin sequence for overexpression (* $P < 0.05$ with respect to equal condition of FM; ** $P < 0.01$ with respect to the first bar, and $P < 0.05$ with respect to second and third bars). ϕ -P, dephosphorylated.

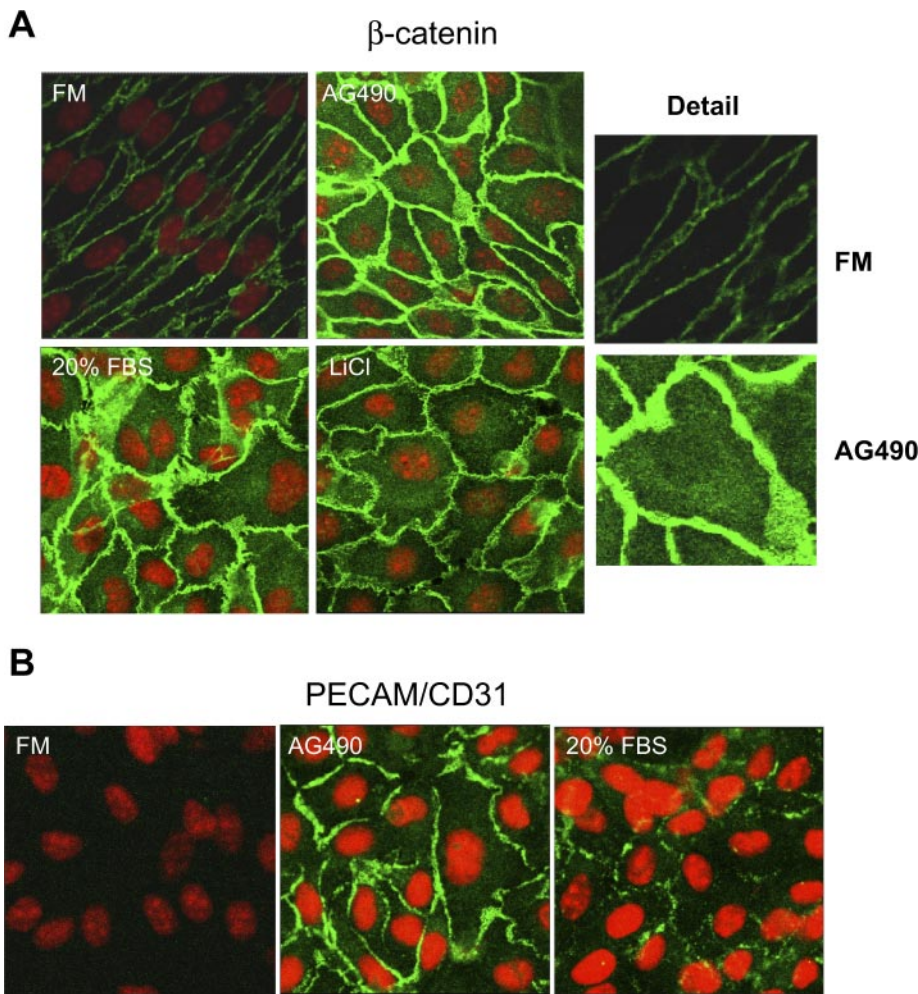


Fig. 4. A: immunofluorescence of β -catenin, as visualized by confocal microscopy. Confluent EC grown on glass coverslips were treated with FM, FM + 20% FBS, FM + AG490 (50 μ mol/l), or FM + LiCl (20 mmol/l) (positive control) for 24 h. Images show whole cell β -catenin localization with differentiated nuclear contrast (400 \times). Detailed images of cells treated with either FM or AG490 are shown without using nuclear contrast, for illustrating nuclear translocation of β -catenin. Nuclear staining has been omitted, to improve visualization of the β -catenin B: immunofluorescence of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1). The same treatments as in A were employed, except for LiCl.

promoted a synergistic activation of TOP/FOP activity. Collectively, all these data indicate a functional role for the translocation of β -catenin observed in this system after AG490 treatment.

A marked increase in PECAM-1 was observed under the same conditions of the β -catenin changes (Fig. 4B). This increase was further confirmed by Western blot (data not shown).

Additional Western blot studies were performed to further characterize the effects of JAK2 inhibition by AG490. These studies suggest that, at least in baseline conditions, AG490 may improve BAEC resistance by means of AKT rather than by other anti-apoptotic proteins, as follows. 1) A significant increase in AKT protein was observed (4.5 ± 0.3 -fold increase in AG490 with respect to FM, $P < 0.05$). 2) No significant changes were found in the Bcl2/Bax ratio (FM 1.00 ± 0.18 vs. AG490 1.19 ± 0.21 , $P = 0.07$, $n = 5$). In the same regard, no changes by AG490 were detected on caspase-3 activity (FM 100 ± 8.1 vs. AG490 113.91 ± 17.3 arbitrary units, $P = \text{NS}$).

Experiments in Detached Conditions

Because EC survival is critically dependent on cell-matrix and cell-cell adhesion (23), a set of experiments was performed

to assess the role of JAK2 pathway inhibition in cell death related to disrupted adhesion and culture in suspension.

A clear-cut protective effect of JAK2 inhibition was evident on BAEC cultured in suspension. BAEC were pretreated with FM containing no FBS or 20% FBS or FM + AG490 at 50 μ mol/l. As shown in Fig. 5A, pretreatment with AG490 induced a marked increment in BAEC viability at different times after detachment. Furthermore, inhibition of apoptotic death in detached cells was assessed by examining DNA degradation. As shown in Fig. 5B, treatment with AG490 blocked DNA laddering, thus indicating that inhibition of apoptosis was an important component of AG490-induced protection against the effects of detachment.

The specific role of JAK2 inhibition was further ascertained by assessing cell death in BAEC transfected with a mutant dominant negative of the JAK2 kinase domain (a gift of Dr Dwayne L. Barber, Ontario Cancer Institute, Toronto, Canada). As seen in Fig. 5C, cell death was significantly inhibited in BAEC transfected with deficient kinase JAK2 against wildtype JAK2 or empty vector. This can be considered a gold standard of JAK2 inhibition and supports the attribution of AG490 effects to JAK2 blockade. From here on, and because of the more direct feasibility of the experiments, the studies on mechanisms have been done mostly

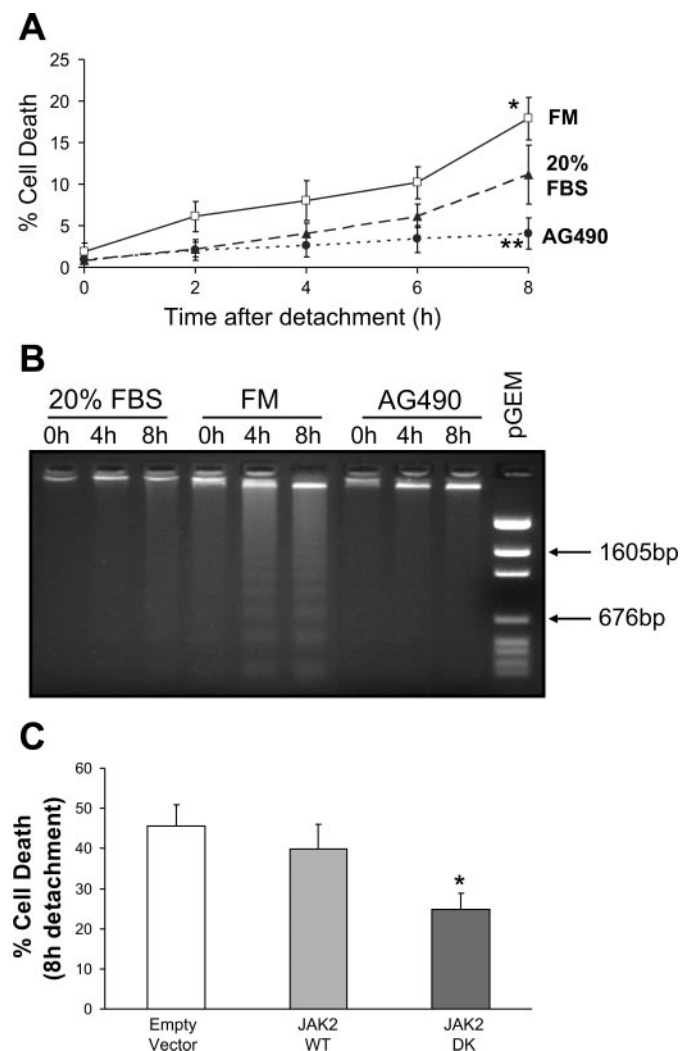


Fig. 5. Protective effect of JAK2 inhibition on EC detachment-induced cell death/anoikis. **A**: cell death progression in EC cultured in suspension after pretreatment (24 h) with FM, FM with 20% FBS, or FM + AG490 (50 μ mol/l) as assayed by flow cytometry (* P < 0.01 with respect to the 20% FBS and AG490 curves and ** P < 0.02 with respect to the 8-h point of 20% FBS curve, n = 5 triplicate experiments). The curves correspond to 5 experiments run in parallel. In all the samples, the same concentration of vehicle (DMSO, 0.1%) was used. Time 0h corresponds to the moment of cell detachment. **B**: DNA ladder from EC, treated as described in Fig. 4A. DNA was extracted at indicated times in suspension culture and run in low-melting agarose gel. **C**: cell death analysis measured at 8 h of suspension culture in EC transfected with plasmids encoding a wildtype form of JAK2 (JAK2 WT), a kinase-deficient form of JAK2 (JAK2 DK), or the empty vector (* P < 0.01 with respect to the other conditions).

using AG490 rather than JAK2 kinase domain dominant negative transfection.

Because of the putative effects of AG490 on the Src pathway, further experiments were done to analyze the possible participation of Src in the observed protective actions against detachment-related cell death. These experiments showed no effect of the Src inhibitor PP2 on the survival of detached BAEC, as follows: %cell death after 8 h of suspension culture, FM 32.9 ± 5.7 vs. PP2 35.1 ± 6.2 (n = 4, P = NS).

The effect of AG490 was not only relevant to BAEC damage, as assessed by flow cytometry, but was also functionally significant in terms of the BAEC growth capability in

reseeding (Fig. 6). Pretreatment with AG490 (50 μ mol/l) induced a marked increase in the yield of reseeding on Matrigel after culture in suspension (no. of cells 7.8 ± 1.2 , 9.4 ± 0.8 , and 12.3 ± 1.1 times higher in AG490-treated samples after 8, 24, and 48 h, respectively; all P < 0.001 with respect to vehicle-treated controls, n = 5, triplicate experiments).

With regard to the mechanisms involved in the increased survival in suspension after JAK2/STAT inhibition, the findings in detached BAEC were in agreement with the results obtained in monolayer BAEC. As shown in Fig. 7A (top), nuclear β -catenin levels are increased in BAEC pretreated with AG490 and lately cultured in suspension compared with FM or 20% FBS. This result posed the question of whether the increased β -catenin has a significant role in improving BAEC survival in detached conditions. This issue was examined by transfecting BAEC with a plasmid that increases the expression of β -catenin. In these conditions, a marked increase in detached BAEC survival was observed. (Fig. 7B), thereby supporting the importance of β -catenin as a major mechanism.

Additional experiments were done to further ascertain the putative mechanisms of the AG490 protective effects in non-adherent cells. As can also be seen in Fig. 7A, meaningful effects of AG490 treatment were found on the following potentially protective mechanisms: 1) higher levels of total AKT; 2) increased levels of phosphorylated AKT, i.e., activated AKT; and 3) increased levels of phosphorylated GSK3 β , i.e., inactivated GSK3 β .

DISCUSSION

Our results provide the first evidence of the potent endothelial cytoprotective effect induced by specific inhibition of the JAK2/STAT pathway. Actually, a singularly important lethal process, i.e., detachment-related cell death, is significantly blocked by pretreatment with the specific JAK2 inhibitor, the tyrphostin AG490, and specifically confirmed by transfection of a JAK2 dominant negative. This effect is accompanied by an increase and redistribution of β -catenin, and by higher levels of total and active phosphorylated forms of a key defensive protein, AKT. Furthermore, the present experiments reveal that a series of mechanisms are activated on JAK2/STAT inhibition.

Although the mechanistic distinction between apoptotic and necrotic forms of cell death is not a central issue of the present investigation, our results, using both DNA laddering and LDH release, indicate that AG490 exerts protective effects on both types of EC elimination. In this regard, the relevant point is that JAK2/STAT inhibition protects BAEC against death triggered by either serum deprivation or detachment.

In BAEC, β -catenin acts both as a vascular endothelial (VE)-cadherin-associated protein in the adherens junction complex and also as a transcriptional activator; the latter role is mediated through its interaction with members of the TCF/Lef family of transcription factors in Wnt signaling (14, 26, 29). In adherent nonstimulated cells, β -catenin is localized to the adhesion complexes; simultaneously, its cytoplasmic levels are kept low, by association with other proteins, e.g., adenomatous polyposis coli (APC) or GSK3 β , which drive cytoplasmic β -catenin to proteasome-mediated degradation. The mechanisms identified in the present study are time related to the protective effect of JAK2 inhibition by AG490. Changes in

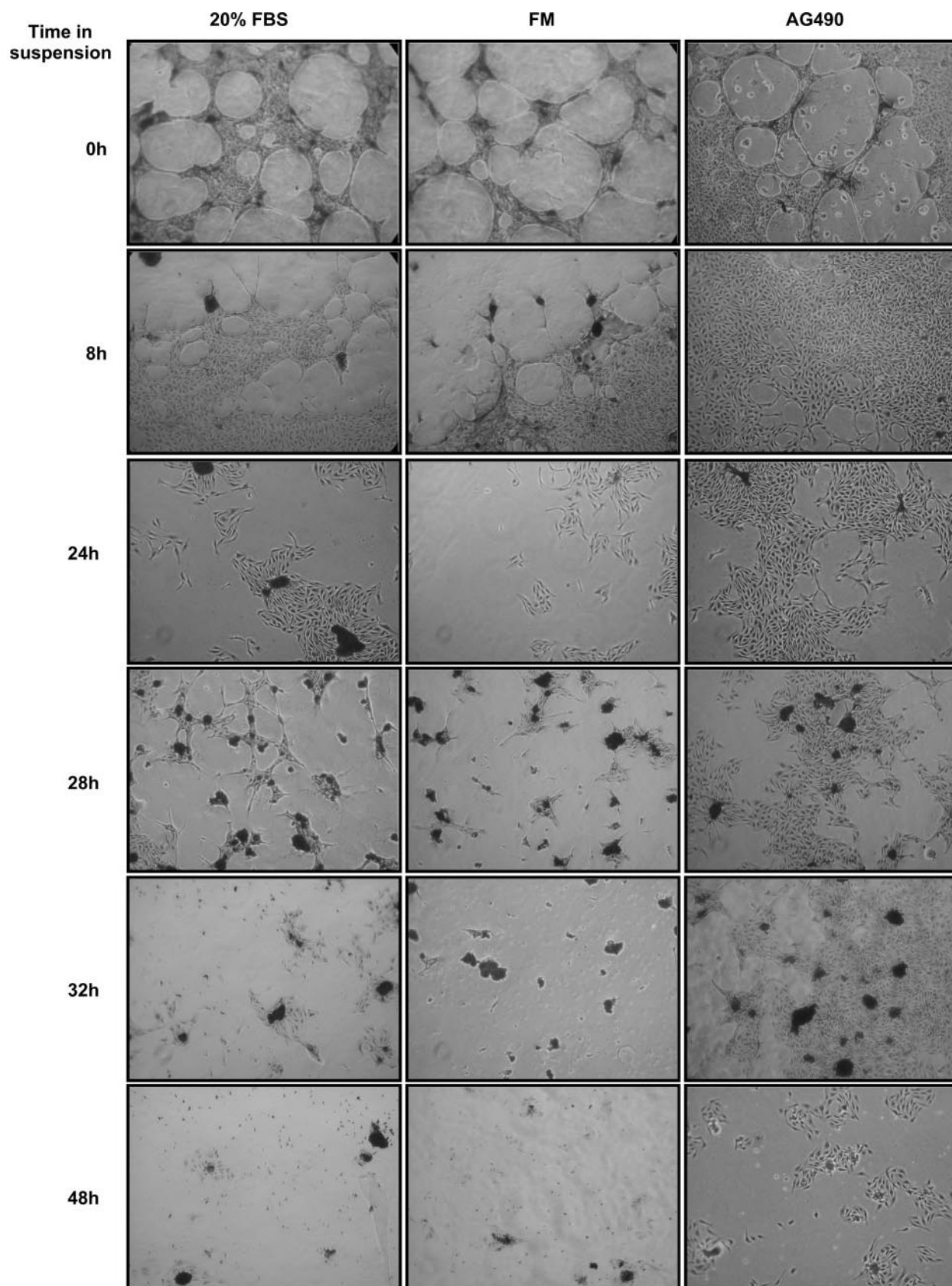


Fig. 6. Effect of AG490 on reseeding efficacy of EC after different times of culture in suspension. EC were pretreated with FM, FM + 20% FBS, or FM + AG490 (50 μ mol/l) for 24 h and cultured in suspension for the times indicated, as described in MATERIALS AND METHODS. Thereafter, EC were collected and reseeded on 12-well plates coated with Matrigel. EC were allowed to grow for 24 h, fixed, stained with crystal violet, and microphotographed ($\times 100$).

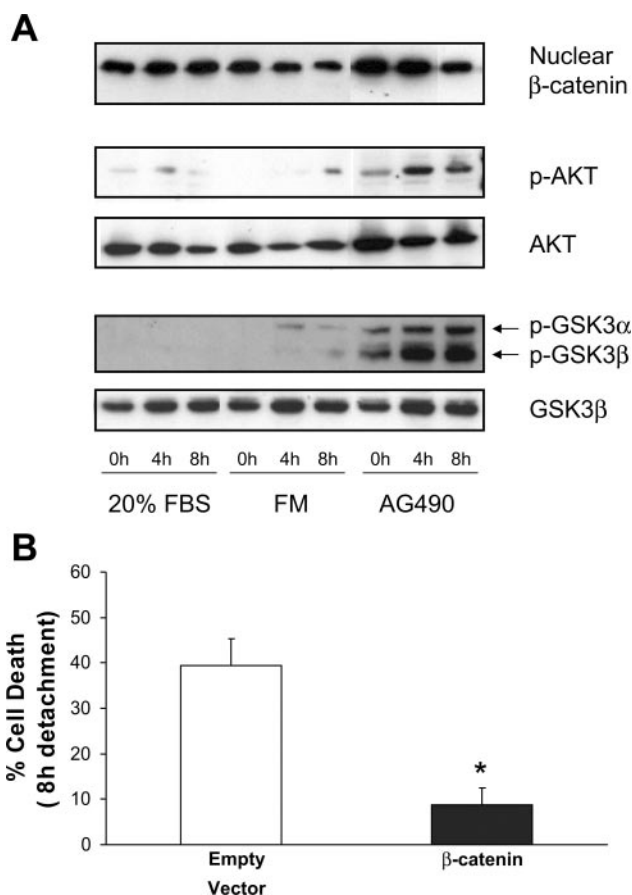


Fig. 7. Influence of β -catenin and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT/glycogen synthase kinase (GSK)3 on EC detachment-induced cell death. **A**: Western blot of nuclear β -catenin, phosphorylated AKT and GSK3 α/β , and total AKT and GSK3 β . Proteins were extracted from cells pretreated with FM, FM + 20% FBS, or FM + AG490 (50 μ mol/l) for 24 h and cultured in suspension for the times indicated. The images shown correspond to samples extracted in 1 typical experiment of 5 with similar results and corresponding to the experiments shown in Fig. 4A. **B**: cell death measured at 8 h of suspension culture. BAEC were transfected with plasmids encoding a wildtype form of β -catenin or the empty vector (* $P < 0.01$ with respect to the other condition).

quantity and distribution of β -catenin, but especially the demonstration of the nuclear localization of its active dephosphorylated form, and the presence of β -catenin-dependent transcriptional activity support a significant role of this protein in the BAEC protective effects; in fact, the pattern found is coincident with that described in death-resistant hemangioma-derived cell lines (17).

Our results involving PECAM-1 are of importance concerning the β -catenin increase and redistribution to the nucleus. Accordingly, as found by Biswas et al. (2), PECAM-1 is determinately associated with protection from degradation and with increased nuclear β -catenin. In consequence, the simultaneous increase of PECAM-1 and β -catenin accompanying JAK2 inhibition is compatible with the existence of an operational sequence of BAEC protection. Of specific interest, our data go beyond the existing information, all in adherent BAEC, and provide a first piece of evidence on the relationship of β -catenin with the fate of BAEC in suspension. The present results strongly suggest that activation and nuclear translocation of β -catenin can be key elements of survival after detachment.

In resting cells, GSK3 β is highly active, and in growth factor deprivation conditions, GSK3 β activation is able to increase EC apoptosis (18). Conversely, inhibition of GSK3 β signaling, mainly through phosphorylation, protects cells from apoptosis under conditions of mitogen deprivation and regulates cell death by anoikis (18). Inhibition of GSK3 β activity results in blockade of β -catenin phosphorylation and subsequent stabilization of cytoplasmic β -catenin, which eventually translocates to the nucleus (8). Our results showing increased levels of phosphorylated GSK3 β in BAEC maintained in suspension after pretreatment with AG490 are inversely related to the increase in β -catenin observed in the same circumstances.

Since results showing protective effects of GSK3 β inhibition have been previously published (18), we focused our studies only on the comparison of β -catenin patterns of response to LiCl and AG490. In this setting, relevant similarities concerning β -catenin turnover were detected. In fact, the increased phosphorylation of GSK3 α and β -catenin increase and translocation under the effect of AG490 are hereby newly described.

Of specific interest, pretreatment of BAEC with AG490 induced a major increase in survival of detached BAEC. This effect was even stronger than that obtained by means of growth factor-rich media, i.e., 20% FBS, and had significant consequences on BAEC reseeding. In fact, no reliable pharmacological tools are available to both prolong life of detached BAEC and enhance their reseeding efficacy, as done by means of AG490. This result can have several practical applications in the field of EC protection.

In terms of mechanism, a strong support for the protective role of β -catenin in the present conditions was provided by the results obtained in β -catenin-transfected BAEC; these cells had a markedly higher survival capability than their empty vector counterparts. To the best of our knowledge, this is the first demonstration that increased β -catenin has a relevant role in prolonging life of BAEC detached from the endothelial monolayer. Furthermore, our results indicate that at least one well-known protective pathway, i.e., PI3K/AKT, is persistently activated in detached conditions under the influence of AG490. The actual functionality of this activation needs further study, by analyzing specific targets of PI3K/AKT activation. On the contrary, the data obtained in the presence of the Src inhibitor, PP2, suggest the absence of a relevant involvement of the Src pathway in BAEC death after detachment and therefore make improbable any possible role of Src inhibition in the effects of AG490. Moreover, it should be noted that the Src inhibitory capability of AG490, albeit in a different experimental system, appears to be rather weak (25).

The present results provide a set of new findings, with relevant potential in terms of practical applications. The strength of the protective effect of JAK2 inhibition against diverse injuries, and particularly against cell detachment-induced death, is particularly valuable.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Alberto Tejedor (Research Unit, Hospital General Gregorio Marañón, Madrid, Spain) for help with image quantitation and Dr. Dwayne L. Barber (Ontario Cancer Institute, Toronto, Canada) for the gift of the dominant negative JAK2.

GRANTS

This study was supported by grants from the Instituto de Salud Carlos III (Red Cardiovascular), Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS: PI: 030888), Comunidad Autónoma de Madrid (CAM: GR/SAL/0418/2004), Sociedad Española de Nefrología and Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica (IRSIN, Entrecanales Trust), the Spanish Ministry of Education, Science and Technology (SAF04-00361), Fundación Jiménez Díaz-Capio and Amgen (Barcelona, Spain). M. A. Castilla and F. R. González-Pacheco are investigators from FIS and CAM, respectively. S. Peñate is a senior research technician from Red Cardiovascular (RECAVA), and J. J. P. Deudero is a fellow from the Instituto Carlos III. F. Neria, A. J. de Solís, and R. Fernández-Sánchez are fellows from Fundación C. Rábago. H. Peinado is supported by a grant from Justesa Imagen SA.

REFERENCES

1. Banes AK, Shaw SM, Tawfik A, Patel BP, Oghi S, Fulton D, Marrero MB. Activation of the JAK/STAT pathway in vascular smooth muscle by serotonin. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C805–C812, 2005.
2. Biswas P, Canosa S, Schoenfeld J, Schoenfeld D, Tucker A, Madri JA. PECAM-1 promotes beta-catenin accumulation and stimulates endothelial cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 212–218, 2003.
3. Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffer A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 119: 629–641, 1992.
4. Castilla MA, Arroyo MV, Aceituno E, Aragoncillo P, Gonzalez-Pacheco FR, Texeiro E, Bragado R, Caramelo C. Disruption of cadherin-related junctions triggers autocrine expression of vascular endothelial growth factor in bovine aortic endothelial cells: effects on cell proliferation and death resistance. *Circ Res* 85: 1132–1138, 1999.
5. Castilla MA, Caramelo C, Gazapo RM, Martin O, Gonzalez-Pacheco FR, Tejedor A, Bragado R, Arroyo MV. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in endothelial cell protection against cytotoxic agents. *Life Sci* 67: 1003–1013, 2000.
6. Castilla MA, Neria F, Renedo G, Pereira DS, Gonzalez-Pacheco FR, Jimenez S, Tramon P, Deudero JJ, Arroyo MV, Yague S, Caramelo C. Tumor-induced endothelial cell activation: role of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C1170–C1176, 2004.
7. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 261–270, 2004.
8. Doble BW, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci* 116: 1175–1186, 2003.
9. Dudley AC, Thomas D, Best J, Jenkins A. The STATs in cell stress-type responses. *Cell Commun Signal* 2: 8, 2004.
10. El Adawi H, Deng L, Tramontano A, Smith S, Mascareno E, Ganguly K, Castillo R, El Sherif N. The functional role of the JAK-STAT pathway in post-infarction remodeling. *Cardiovasc Res* 57: 129–138, 2003.
11. Gorina R, Petegnief V, Chamorro A, Planas AM. AG490 prevents cell death after exposure of rat astrocytes to hydrogen peroxide or proinflammatory cytokines: involvement of the Jak2/STAT pathway. *J Neurochem* 92: 505–518, 2005.
12. Grossmann J. Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis–Anoikis.” *Apoptosis* 7: 247–260, 2002.
13. Harada M, Qin Y, Takano H, Minamino T, Zou Y, Toko H, Ohtsuka M, Matsuura K, Sano M, Nishi J, Iwanaga K, Akazawa H, Kunieda T, Zhu W, Hasegawa H, Kunisada K, Nagai T, Nakaya H, Yamauchi-Takahara K, Komuro I. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 11: 305–311, 2005.
14. Hatsell S, Rowlands T, Hiremath M, Cowin P. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 8: 145–158, 2003.
15. Hattori R, Maulik N, Otani H, Zhu L, Cordis G, Engelman RM, Siddiqui MA, Das DK. Role of STAT3 in ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1929–1936, 2001.
16. Hortelano S, Castilla M, Torres AM, Tejedor A, Bosca L. Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 11: 2315–2323, 2000.
17. Ilan N, Tucker A, Madri JA. Vascular endothelial growth factor expression, beta-catenin tyrosine phosphorylation, and endothelial proliferative behavior: a pathway for transformation? *Lab Invest* 83: 1105–1115, 2003.
18. Kim HS, Skurk C, Thomas SR, Bialik A, Suhara T, Kureishi Y, Birnbaum M, Keaney JF Jr, Walsh K. Regulation of angiogenesis by glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem* 277: 41888–41896, 2002.
19. Liu W, Davis DW, Ramirez K, McConkey DJ, Ellis LM. Endothelial cell apoptosis is inhibited by a soluble factor secreted by human colon cancer cells. *Int J Cancer* 92: 26–30, 2001.
20. Mascareno E, El Shafei M, Maulik N, Sato M, Guo Y, Das DK, Siddiqui MA. JAK/STAT signaling is associated with cardiac dysfunction during ischemia and reperfusion. *Circulation* 104: 325–329, 2001.
21. Maziere C, Conte MA, Maziere JC. Activation of JAK2 by the oxidative stress generated with oxidized low-density lipoprotein. *Free Radic Biol Med* 31: 1334–1340, 2001.
22. Meydan N, Grunberger T, Dadi H, Shahar M, Arpaia E, Lapidot Z, Leeder JS, Freedman M, Cohen A, Gazit A, Levitzki A, Roifman CM. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor. *Nature* 379: 645–648, 1996.
23. Michel JB. Anoikis in the cardiovascular system: known and unknown extracellular mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 2146–2154, 2003.
24. Neria F, Caramelo C, Peinado H, Gonzalez-Pacheco FR, Deudero JJ, de solis AJ, Fernandez Sanchez R, peñate S, Cano A, Castilla MA. Endothelial protection by inhibition of the JAK/STAT pathway in monolayer and detached EC (Abstract). *Nefrología* 25: 7, 2005.
25. Oda Y, Renaux B, Borge J, Saifeddine M, Fujita DJ, Hollenberg MD. cSrc is a major cytosolic tyrosine kinase in vascular tissue. *Can J Physiol Pharmacol* 77: 606–617, 1999.
26. Orford K, Orford CC, Byers SW. Exogenous expression of beta-catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest. *J Cell Biol* 146: 855–868, 1999.
27. Sandberg EM, Sayeski PP. Jak2 tyrosine kinase mediates oxidative stress-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 279: 34547–34552, 2004.
28. Uchimura H, Marumo T, Takase O, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, Saruta T, Hishikawa K, Fujita T. Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 16: 997–1004, 2005.
29. Weng Z, Xin M, Pablo L, Grueneberg D, Hagel M, Bain G, Muller T, Papkoff J. Protection against anoikis and down-regulation of cadherin expression by a regulatable beta-catenin protein. *J Biol Chem* 277: 18677–18686, 2002.
30. Yadav A, Kalita A, Banerjee K. JAK/STAT3 pathway is involved in survival of neurons in response to insulin like growth factor and negatively regulated by suppression of cytokine signaling-3. *J Biol Chem* 280: 31830–31840, 2005.
31. Yahata Y, Shirakata Y, Tokumaru S, Yamasaki K, Sayama K, Hanakawa Y, Detmar M, Hashimoto K. Nuclear translocation of phosphorylated STAT3 is essential for vascular endothelial growth factor-induced human dermal microvascular endothelial cell migration and tube formation. *J Biol Chem* 278: 40026–40031, 2003.

American Journal of Transplantation

JAK2 INHIBITION PROTECTS ENDOTHELIAL AND TUBULAR EPITHELIAL CELLS AGAINST OXIDATIVE INJURY: IN VITRO AND IN VIVO EVIDENCE

Journal:	<i>American Journal of Transplantation</i>
Manuscript ID:	AJT-O-07-00393
Manuscript Type:	O - Original Articles
Date Submitted by the Author:	02-Apr-2007
Complete List of Authors:	Neria, Fernando; Fundacion Jimenez Diaz-Capio, Laboratorio de Nefrologia e Hipertension Castilla, Maria; Fundacion Jimenez Diaz-Capio, Laboratorio de Nefrologia e Hipertension Fernandez-Sanchez, Ruth; Fundacion Jimenez Diaz-Capio, Laboratorio de Nefrologia e Hipertension Gonzalez-Pacheco, Francisco; Fundacion Jimenez Diaz-Capio, Laboratorio de Nefrologia e Hipertension Deudero, Juan; Fundacion Jimenez Diaz-Capio, Laboratorio de Nefrologia e Hipertension Penate, Silvia; Fundacion Jimenez Diaz-Capio, Laboratorio de Nefrologia e Hipertension Tejedor, Alberto; Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Laboratorio de Fisiopatología Renal Manzarbeitia, Felix; Fundacion Jimenez Diaz-Capio, Laboratorio de Nefrologia e Hipertension Caramelo, Carlos; Fundacion Jimenez Diaz-Capio, Laboratorio de Nefrologia e Hipertension
Keywords:	cyclosporine A, epithelial cells, endothelial cells, peritubular capillary, oxidant stress





Papel del VEGF en la respuesta celular a la agresión

M. V. Álvarez-Arroyo, S. Yagüe, F. R. González-Pacheco, M. A. Castilla, Y. Suzuki, S. Jiménez, J. J. P. Deudero, F. Neria, L. Velasco y C. Caramelo

Laboratorio de Nefrología e Hipertensión. Clínica de la Concepción. Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica (IRSIN). Madrid.

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es un potente mediador angiogénico endotelial con capacidades multifuncionales^{1,2}. Recientemente, trabajos de varios laboratorios, han resaltado la función del VEGF como factor de viabilidad endotelial^{3,4}. La integridad y viabilidad endotelial es fundamental en múltiples situaciones, incluyendo entre otras la isquemia/reperfusión, neoplasia, inflamación, perfusión de órganos destinados al trasplante, shock y reendotelización de superficies desnudas⁵. El VEGF actúa a través de la unión a receptores específicos de membrana con actividad tirosina quinasa (VEGFR1 y VEGFR2) y al receptor complementario neuropilina². La unión del VEGF a cada uno de sus receptores da lugar a la activación de varias vías de señalización, siendo el receptor VEGFR2 el más importante desde un punto de vista funcional^{1,2,4}. El mecanismo de señalización intracelular del VEGF, aunque aclarado solo en forma parcial, involucra: fosforilación de al menos 11 proteínas, incluyendo fosfolipasa $C\gamma$ (PLC γ) y proteínas asociadas, proteínas del aparato de adhesión, fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K), pico transitorio de Ca^{2+} libre citosólico (Ca^{2+}_i), activación de MAPK (*proteínas quinasa activadas por mitógeno*), incluyendo ERKs, JNKs, y p38, y producción de óxido nítrico (NO)^{4,6}. El control de la expresión del gen del VEGF ocurre tanto a nivel pre como post-transcripcional^{1,2}. Los cambios en la tensión del O_2 son el mecanismo esencial en la regulación transcripcional del VEGF, a través de la inducción del factor inducido por hipoxia 1 (HIF-1). Varias citoquinas y factores de crecimiento pueden regular este gen, a su vez se han observado diferencias en la expresión del gen cuando las células están sometidas a agentes agresores.

VEGF Y VIABILIDAD ENDOTELIAL

Las propiedades citoprotectoras del VEGF exógeno sobre las células endoteliales (CE) descritas hasta ahora incluyen la expresión de las proteínas antiapoptóticas bcl-2 y survivina, la prostaciclina, NO y el papel de la vía PI3K/Akt⁷⁻⁹. La proteína antiapoptótica bcl-2 regula la apertura del poro mitocondrial de permeabilidad transitoria inhibiendo la salida del citocromo c al citosol. La proteína Akt inhibe la apoptosis a través de su interacción con caspasa 9, su regulación de NF κ B (*nuclear factor-kappa B*) y su actividad inhibitoria de p38MAPK (importante modulador del programa proapoptótico en CE)^{7,10,11}. A su vez, Akt es responsable, en parte, de la producción de NO por VEGF, a través de la fosforilación en Ser/Tre de la NO sintasa endotelial (eNOS)^{12,13}.

Bajo ciertas condiciones, la exposición de las CE a especies reactivas de oxígeno (H_2O_2), al desorganizador de los filamentos de actina citocalasina D (CyD), a la disrupción de las uniones interendoteliales, o al medicamento inmunosupresor ciclosporina A (CsA), resulta en un efecto protector significativo sobre la apoptosis producida por la depleción de suero fetal bovino (estudiada por fragmentación del ADN, citometría de flujo con yoduro de propidio, activación de caspasa 3 y/o cambios en el potencial de membrana mitocondrial); por el contrario, concentraciones más altas de estos agentes son claramente tóxicas para el endotelio^{14,15}. Además, las CE pretratadas con dosis protectoras de CsA producen tolerancia a dosis sucesivas más elevadas y tóxicas de esta droga inmunosupresora respuesta adaptativa¹⁶. El interés específico de la respuesta adaptativa radica en que permitiría plantearse un preconditionamiento de los pacientes con dosis menores de esta droga, con la finalidad de reducir los efectos secundarios indeseables de su utilización crónica. El hecho de que la CsA, la CyD y el H_2O_2 produzcan ambos efectos citoprotector y tóxico en las CE dependiendo de concentración podría estar relacionado con la estimulación de mecanismos protectores a bajas concentraciones, como el VEGF, que

Correspondencia: Dra. M. V. Álvarez-Arroyo
Dr. C. Caramelo

Lab. de Nefrología e Hipertensión
Fundación Jiménez Díaz
Avda. Reyes Católicos, 2
28040 Madrid
E-mail: mvarroyo@fjd.es
ccaramelo@fjd.es

son desbordados por la toxicidad producida por dosis más elevadas de estos agentes agresores. Esto se ha demostrado al comprobar que la utilización de un anticuerpo bloqueante de los efectos del VEGF hace que el efecto citoprotector de estas sustancias desaparezca, potenciándose drásticamente su toxicidad endotelial¹⁴⁻¹⁶.

El papel citoprotector del VEGF autocrino está en parte relacionado con su sobreexpresión génica. En datos de nuestro Laboratorio, observamos que la expresión y síntesis autocrina del VEGF aumenta cuando las CE se tratan con CyD o H₂O₂, pero no cuando se tratan con CsA¹⁴⁻¹⁶.

Los resultados obtenidos anteriormente nos llevaron a profundizar en el estudio de: los mecanismos de acción de la CsA, desde el punto de vista de su relación con el VEGF. En linfocitos, la CsA se une e inhibe una proteína citoplasmática que es una isopropil-propril isomerasa, la ciclofilina (CyP). El complejo formado por CsA-CyP se une e inhibe una fosfatasa, la calcineurina (Cn); la Cn desfosforila al factor nuclear activador de las células T (NFAT), que migra al núcleo favoreciendo la activación génica de las linfoquinas esenciales para la proliferación de células T. No está establecido, sin embargo, si los efectos tóxicos de la CsA sobre el endotelio se deben a su unión a CyP o a Cn. En experimentos empleando análogos de la CsA (MeVal-4-CsA, Meile-4-CsA) que unen CyP pero no inhiben Cn (testados por la incapacidad de bloquear la unión del NFAT a proteínas nucleares), se ha podido establecer por primera vez que los efectos citoprotectores y citotóxicos de la CsA en el endotelio implican una vía independiente de la unión a Cn¹⁶.

Con relación a los mecanismos de transmisión de señal del VEGF, observamos que CE pretratadas con concentraciones citoprotectoras de CsA o MeVal-4-CsA durante 24 h presentan un aumento del pico transitorio de Ca²⁺, producido por VEGF significativamente mayor que las CE no preincubadas con estas drogas¹⁶. A su vez, el efecto protector aumenta cuando las CE se les trata conjuntamente con CsA y VEGF exógeno. Por último el efecto protector de la CsA y sus análogos desaparece cuando las CE se preincuban con un anticuerpo bloqueante de los efectos del VEGFR2¹⁶. El VEGFR2 se incrementa significativamente cuando las CE se tratan con CsA y/o sus análogos tanto a dosis tóxicas, como protectoras, y en la respuesta adaptativa de esta droga¹⁶. Se observan resultados similares con otros agentes agresores, como por ejemplo el H₂O₂ (Gonzalez-Pacheco y cols., datos no publicados). Estos resultados sugieren consistentemente que el nivel de expresión de VEGFR2 constituye un punto de control princi-

pal del papel del VEGF en los efectos de la CsA en el endotelio.

Para analizar los mecanismos por el cual VEGF ejerce su acción protectora, la utilización de un inhibidor de PI3K (LY294002) bloquea el efecto protector de la CsA sobre la apoptosis provocada por una depleción de suero fetal bovino en CE CsA (Yagüe y cols, datos no publicados). A su vez el LY294002 bloquea el incremento en la expresión del VEGF en CE tratadas con H₂O₂ (González-Pacheco y cols., datos no publicados) y el incremento de VEGFR2 en CE tratadas con CsA (Álvarez-Arroyo y cols., datos no publicados). Estos resultados confirman y amplían a la regulación del VEGF endógeno y su receptor VEGFR2 el papel de la vía PI3K en la citoprotección por VEGF. Tanto el VEGF, como la CsA provocan un aumento en la producción de NO y una estimulación de la eNOS, datos observados por otros autores y confirmados por nosotros. Sobre esta base, es posible que el NO contribuya al efecto protector de la CsA y otros agentes agresores sobre el endotelio, lo que se confirma en la observación de que la protección endotelial debida a bajas concentraciones de esta droga desaparece en presencia de un inhibidor de la formación de NO (L-NAME) (datos no publicados). En conjunto, los resultados que describimos abren un nuevo camino en el estudio de las bases celulares de la toxicidad endotelial ante la agresión y, por consiguiente, pueden contribuir a posibles soluciones del problema. La caracterización del papel de la CyP y su relación con el VEGFR2 aporta una base experimental a aspectos en los que las interpretaciones existentes hasta la actualidad se basaban en extrapolaciones de los conocimientos obtenidos en linfocitos, y que como se ve, no son totalmente válidas en las CE.

Como corolario a los resultados anteriores, una de las preguntas que nos planteamos es si el papel del protector del VEGF ante la agresión es un efecto específico del endotelio, o si puede extenderse a otros órganos diana de la acción de la CsA, como los túbulos renales¹⁷. Trabajos recientes han demostrado que la administración exógena del VEGF protege al riñón del daño tubular producido por CsA¹⁸. Estos estudios se basaron en la hipótesis de que la afectación tubular provocada por la CsA sea secundaria a daño de los capilares peritubulares. Durante el último año hemos obtenido resultados que demuestran que el VEGF endógeno, *in vivo* e *in vitro*, tiene un papel relevante en la nefrotoxicidad provocada por la CsA y que la inhibición del VEGF mediante un anticuerpo bloqueante da lugar a una clara intensificación del daño tubular¹⁹. Al igual que en el endotelio, confirmamos que existe una expresión basal de VEGF en córtex renales de ratones controles y en células tubu-

lares renales en cultivo controles. Esta expresión se intensifica cuando los ratones y las células se tratan con un agente agresor como la CsA¹⁹. Por tanto el VEGF autocrino actúa como mediador de citoprotección en otros tipos celulares diferentes al endotelio.

VEGF, VIABILIDAD ENDOTELIAL Y PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSPs)

Una parte considerable de las aplicaciones clínicas derivadas de la inducción del VEGF como respuesta a la agresión están relacionadas con su efecto protector^{3,14,4}. El VEGF protege del estrés osmótico, de agentes tóxicos, de neoplasias, de procesos de isquemia/reperfusión, de la agresión farmacológica y de la hipoxia⁵. En la mayoría de estos procesos también se ha descrito un aumento de la expresión y síntesis de una familia de proteínas protectoras, muy conservadas evolutivamente, ampliamente expresadas y muy abundantes en las células de mamíferos, las HSPs^{20,21}. En las células vasculares, se ha detectado inducción de las HSPs tanto en procesos fisiológicos como patológicos, asociándose esta inducción a un papel protector^{20,21}.

Las HSPs se clasifican de acuerdo a su peso molecular. Su función primordial es la de actuar como «chaperones» (proteínas de acompañamiento de otras proteínas en diversas circunstancias funcionales) en condiciones fisiológicas y de estrés. La regulación de las HSPs se lleva a cabo tanto a nivel post-transcripcional como pretranscripcional y se encuentran reguladas por factores transcripcionales específicos (HSFs)^{22,21}. Se han descrito tres HSFs en los mamíferos: HSF1, HSF2 y HSF4. El HSF1 y el HSF2 son los más abundantes y están expresados ubiquitariamente, mientras que el HSF4 sólo se ha encontrado en cerebro y pulmón^{22,21}. El HSF1 y HSF2 existen constitutivamente en una forma libre en el citosol, y ante situaciones de estrés son hiperfosforilados por miembros de la familia de las MAPK como ERK1, SAP/JNK y p38, formando un homotrímero que migra al núcleo, donde se une a una región similar del ADN. HSF1 y HSF2 difieren en los mecanismos de activación y en la respuesta transcripcional^{22,21}. Una de las hipótesis sugerida por nuestro trabajo reciente es que el endotelio, ante una situación de estrés, podría responder con un sistema de defensa unitario y polivalente, en el cual se pondrían en juego una serie de proteínas relacionadas entre sí, y controladas por el VEGF, cuya finalidad sería restablecer de nuevo el equilibrio. En términos de efecto celular, existen considerables similitudes entre las HSPs y el VEGF: 1) Ambos grupos de proteínas se expresan en los mismos procesos fisiológicos y patológicos como res-

puesta defensiva de las células al estrés^{4,20}. 2) Son reguladas a nivel transcripcional por NO, H₂O₂, metales pesados, hipoxia, o análogos de aminoácidos^{12,4}. 3) Tanto el VEGF como las HSPs son claves en la regulación de la apoptosis, inhibiendo la activación de las caspasas y favoreciendo la síntesis de proteínas antiapoptóticas como bcl-2^{9,23-26}. 4) La proteína quinasa C delta (PKCd) regula la activación transcripcional del HSF y HIF1 por hipoxia, siendo la PI3K un regulador de la translocación del PKCd²⁷. 5) Ambos grupos de proteínas pueden ejercer su función actuando como activadores o inhibidores de la transcripción de genes. Todas estas circunstancias comunes entre HSPs y VEGF apoyan nuestra hipótesis de trabajo. La HSP90 es esencial para la activación del HIF1 por hipoxia, pero además se asocia con la eNOS, favoreciendo su fosforilación por PI3K/Akt¹². El VEGF promueve la formación y estabilización de este complejo multiproteico¹³. Se ha descrito la interacción de la HSP70 con dominios de transactivación de factores transcripcionales como el NFkB, que a su vez está implicado en la regulación del VEGF y VEGFR2²⁸. El NO, JNK y p38, que están implicados en la estimulación de la HSP70 y HSP25/27 respectivamente²⁹, forman parte del mecanismo de señalización del VEGF⁴, por lo que es plausible que el VEGF pueda regular la HSP70 vía NO y/o JNK y la HSP25/27 vía p38. La regulación de las HSPs por el VEGF es un tema complejo, debido a las interacciones existentes entre ambos. Por ello, tanto la respuesta protectora como tóxica a nivel endotelial de las HSPs y el VEGF están sometidas a un fino equilibrio dependiente de diferentes factores que pueden simultáneamente inducir la expresión de proteínas protectoras y la muerte celular.

Resultados de nuestro laboratorio muestran que la inhibición funcional de las HSPs mediante geldanamicina potencia drásticamente la toxicidad de la CsA y de los análogos de la CsA. Además, la CsA induce un aumento en la síntesis de la HSP70 tanto a dosis protectoras, como tóxicas. La importancia de este hecho es evidente, dada la importancia de la HSP70 en el repliegamiento de proteínas desnaturalizadas, en su acción antiapoptótica y en la respuesta adaptativa celular. Más aún, cuando las CE se preincubaban con un anticuerpo específico anti-VEGF, el incremento en la síntesis de la HSP70 producido por dosis protectoras de CsA y/o análogos de CsA disminuye significativamente. Como confirmación de estos hallazgos, al tratar CE con VEGF exógeno, se observa un aumento significativo de HSP70 (Álvarez-Arroyo, datos no publicados). En el momento actual, el Laboratorio de Nefrología-Hipertensión está estudiando los mecanismos responsables de la interacción entre estos dos mecanismos de defensa ante la agresión.

Una visión colectiva de los resultados enunciados indica que el VEGF cumple un papel singular en la unificación de señales citoprotectoras en CE en situación quiescente y, por lo tanto, análoga a la que existe en la pared vascular normal. Aunque predecible, la coordinación de los diferentes mecanismos expuestos constituye el trasfondo de una respuesta que, aunque posee una serie de elementos comunes, es flexible y diferenciada para cada tipo diferente de agresión. Basados también en los datos presentes, debemos resaltar la notable complejidad de la respuesta citoprotectora en un tipo de células que, como las endoteliales, se encuentran en una posición anatómica particularmente accesible a la agresión.

BIBLIOGRAFÍA

- Ferrara N: Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 280 (6): C1358-C1366, 2001.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z: Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13 (1): 9-22, 1999.
- Álvarez Arroyo MV, Caramelo C, Ángeles CM, González Pacheco FR, Martín O, Arias J: Role of vascular endothelial growth factor in the response to vessel injury. *Kidney Int Suppl.* 68 S7-S9, 1998.
- Zachary I: Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol* 280 (6): C1375-C1386, 2001.
- Minowada G, Welch WJ: Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest* 95 (1): 3-12, 1995.
- Petrova TV, Makinen T, Alitalo K: Signaling via vascular endothelial growth factor receptors. *Exp Cell Res* 253 (1): 117-130, 1999.
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 273 (46): 30336-30343, 1998.
- He H, Venema VJ, Gu X, Venema RC, Marrero MB, Caldwell RB: Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem* 274 (35): 25130-25135, 1999.
- Nor JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ: Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol* 154 (2): 375-384, 1999.
- Flusberg DA, Numaguchi Y, Ingber DE: Cooperative control of Akt phosphorylation, bcl-2 expression, and apoptosis by cytoskeletal microfilaments and microtubules in capillary endothelial cells. *Mol Biol Cell* 12 (10): 3087-3094, 2001.
- Gratton JP, Morales-Ruiz M, Kureishi Y, Fulton D, Walsh K, Sessa WC: Akt down-regulation of p38 signaling provides a novel mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated cytoprotection in endothelial cells. *J Biol Chem* 276 (32): 30359-30365, 2001.
- Fontana J, Fulton D, Chen Y, Fairchild TA, McCabe TJ, Fujita N, Tsuruo T, Sessa WC: Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. *Circ Res* 90 (8): 866-873, 2002.
- Brouet A, Sonveaux P, Dessy C, Balligand JL, Feron O: Hsp90 ensures the transition from the early Ca^{2+} -dependent to the late phosphorylation-dependent activation of the endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-exposed endothelial cells. *J Biol Chem* 276 (35): 32663-32669, 2001.
- Castilla MA, Caramelo C, Gazapo RM, Martín O, González-Pacheco FR, Tejedor A, Bragado R, Álvarez-Arroyo MV: Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in endothelial cell protection against cytotoxic agents. *Life Sci* 67 (9): 1003-1013, 2000.
- Castilla MA, Álvarez-Arroyo MV, Aceituno E, Aragoncillo P, González-Pacheco FR, Texeiro E, Bragado R, Caramelo C: Disruption of cadherin-related junctions triggers autocrine expression of vascular endothelial growth factor in bovine aortic endothelial cells: effects on cell proliferation and death resistance. *Circ Res* 85 (12): 1132-1138, 1999.
- Álvarez-Arroyo MV, Yagüe S, Wenger RM, Pereira DS, Jiménez S, González-Pacheco FR, Castilla MA, Deudero JJ, Caramelo C: Cyclophilin-mediated pathways in the effect of cyclosporin A on endothelial cells: role of vascular endothelial growth factor. *Circ Res* 91 (3): 202-209, 2002.
- Gallego MJ, García Villalón AL, López Farre AJ, García JL, Garrón MP, Casado S, Hernando L, Caramelo CA: Mechanisms of the endothelial toxicity of cyclosporin A. Role of nitric oxide, cGMP, and Ca^{2+} . *Circ Res* 74 (3): 477-484, 1994.
- Kang DH, Kim YG, Andoh TF, Gordon KL, Suga S, Mazzali M, Jefferson JA, Hughes J, Bennett W, Schreiner GF, Johnson RJ: Post-cyclosporine-mediated hypertension and nephropathy: amelioration by vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol* 280 (4): F727-F736, 2001.
- Álvarez-Arroyo MV, Suzuki Y, Yagüe S, Lorz C, Jiménez S, Soto C, Barat A, Belda E, González-Pacheco FR, Deudero JJP, Castilla MA, Egido J, Ortiz A, Caramelo C: Role of endogenous endothelial growth factor in tubular cell protection against acute cyclosporin toxicity. *Transplantation*, 2002 (en prensa).
- Benjamin IJ and McMillan DR: Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 83 (2): 117-132, 1998.
- Mathew A, Mathur SK, Jolly C, Fox SG, Kim S, Morimoto RI: Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 21 (21): 7163-7171, 2001.
- Christians ES, Yan LJ, Benjamin IJ: Heat shock factor 1 and heat shock proteins: critical partners in protection against acute cell injury. *Crit Care Med* 30 (1 Supl.): S43-S50, 2002.
- Kim YM, de Vera ME, Watkins SC, Billiar TR: Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 272 (2): 1402-1411, 1997.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B: Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 17 (9): 5317-5327, 1997.
- Ricci JE, Maulon L, Battaglione-Hofman V, Bertolotto C, Luciano F, Mari B, Hofman P, Auberger P: A Jurkat T cell variant resistant to death receptor-induced apoptosis. Correlation with heat shock protein (Hsp) 27 and 70 levels. *Eur Cytokine Netw* 12 (1): 126-134, 2001.
- Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES: Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2 (8): 476-483, 2000.
- Baek SH, Lee UY, Park EM, Han MY, Lee YS, Park YM: Role of protein kinase C δ in transmitting hypoxia signal to HSF and HIF-1. *J Cell Physiol* 188 (2): 223-235, 2001.
- Malhotra V, Wong HR: Interactions between the heat shock response and the nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Crit Care Med* 30 (1 Supl.): S89-S95, 2002.
- Defranco DB: Role of molecular chaperones in subnuclear trafficking of glucocorticoid receptors. *Kidney Int* 57 (4): 1241-1249, 2000.



Respuesta reticulocitaria tras cese inmediato de administración de eritropoyetina recombinante humana en enfermos en hemodiálisis crónica. Implicaciones en la terapia de la anemia

C. Caramelo, C. Soto, F. Neria, M. D. López, S. Jiménez, M. Albalade, R. de Oña, P. Llamas y J. J. P. Deudero

Servicios de Hematología y Nefrología. Clínica de la Concepción. Universidad Autónoma de Madrid. Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica (IRSIN). Madrid. España.

Parte de estos datos se presentó en forma de resumen en el XXXIII Congreso de la SEN de Palma de Mallorca (2003), habiendo recibido el Primer Premio de Posters.

RESUMEN

La retirada brusca del tratamiento con eritropoyetina recombinante humana (rHuEPO) en pacientes con insuficiencia renal crónica provoca la reaparición de anemia. Sin embargo, los mecanismos de este fenómeno no se conocen suficientemente. El presente estudio examina la respuesta a la retirada brusca de rHuEPO en pacientes en hemodiálisis crónica (HD).

El estudio se realizó en 10 pacientes en HD que recibían habitualmente rHuEPO. La administración de rHuEPO se interrumpió durante 7 días, tras los cuales se reinició. A los 0, 7 y 15 días, se midieron hemoglobina, hematocrito y el patrón de maduración de los reticulocitos. Con el fin de determinar el papel específico de la uremia en los fenómenos observados, se realizó un estudio complementario en 10 ratas Wistar tratadas con rHuEPO. Tras dos semanas con rHuEPO, se retiró el tratamiento a la mitad de los animales mientras que se mantuvo en el resto otra semana más. Se determinaron hemoglobina, hematocrito y patrón de maduración de reticulocitos.

Los cambios observados en los distintos subtipos reticulocíticos entre el día 0 y el día 7 fueron los siguientes: reticulocitos totales: $18,2 \pm 0,9$ vs $14,3 \pm 1,2\%$ ($p < 0,05$); alta fluorescencia (HFR): $2,6 \pm 0,4$ vs $0,75 \pm 0,2\%$ ($p < 0,001$); fluorescencia media (MFR): $13,0 \pm 1,1$ vs $6,6 \pm 0,9\%$ ($p < 0,02$); y baja fluorescencia (LFR): $84,2 \pm 1,4$ vs $92,7 \pm 1\%$ (p NS). El nivel basal (día 0) se recuperó a los 7 días de comenzar de nuevo la administración de rHuEPO (p NS). Los valores de hemoglobina y hematocrito disminuyeron al final del estudio (día 14) a pesar de reiniciarse la rHuEPO el día 7 ($p < 0,02$). Cambios similares se observaron en las ratas no urémicas.

Recibido: 12-I-2004.

En versión definitiva: 12-IV-2004.

Aceptado: 19-IV-2004.

Correspondencia: Dr. Carlos Caramelo

Servicio de Nefrología

Clínica de la Concepción

Universidad Autónoma de Madrid

Av. Reyes Católicos, 2

28040 Madrid

E-mail: ccaramelo@fjd.es

La rHuEPO induce cambios relevantes en el patrón reticulocítico, provocando una reducción de las formas inmaduras. Este cambio es independiente del estado urémico del individuo y sugiere la conveniencia de no efectuar una retirada brusca del tratamiento crónico con rHuEPO.

Palabras clave: **Suspensión de eritropoyetina. Reticulocitos inmaduros. Hemodiálisis. Ratas normales. Detección del uso de eritropoyetina.**

RETICULOCYTE RESPONSE AFTER IMMEDIATE WITHDRAWAL OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN IN CHRONIC HEMODIALYSIS PATIENTS

SUMMARY

The sudden interruption of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) in end-stage renal disease (ESRD) patients leads to rapid anemization. The mechanisms of this phenomenon are, however, insufficiently understood. The present study examined the response to immediate rHuEPO withdrawal in dialysis patients.

Methods: 10 chronic hemodialysis (HD) patients regularly receiving rHuEPO were studied. rHuEPO was stopped and reinitiated after 7 days. Reticulocyte profile, haemoglobin and haematocrit were measured at 0, 7 and 15 days.

As a complementary study, and with the purpose of analyzing whether uremia was a relevant factor, 10 non-uremic male Wistar rats were treated with rHuEPO. After two weeks, rHuEPO was withdrawn in 5 animals, and continued for 7 additional days in the remainder. The same variables than in the human study were determined.

Results: Changes in reticulocyte subtypes from baseline to day 7 were: total 18.2 ± 0.9 vs $14.3 \pm 1.8\%$ ($p < 0.06$); high-fluorescence (HFR): 2.6 ± 0.4 vs 0.75 ± 0.2 ($p < 0.001$); medium-fluorescence (MFR): 13.0 ± 1.1 vs $6.6 \pm 0.9\%$ ($p < 0.02$); and low-fluorescence (LFR): 84.2 ± 1.4 vs $92.7 \pm 1\%$ (p NS). The baseline pattern was recovered upon 7 days of rHuEPO reinitiation (p NS). Mean hemoglobin and hematocrit decreased by day 14 ($p < 0.02$) in spite of rHuEPO reinitiation at day 7. In non-uremic rats, changes were similar to that in the ESRD patients.

Conclusion: rHuEPO induces changes in the reticulocyte pattern, consisting in a reduction of immature reticulocytes. These changes appear to be independent of the presence of uremia. Accordingly, complete rHuEPO withdrawal in HD patients will cause a rapidly-developing anaemia due to an alteration in the reticulocyte maturation series; therefore, sudden rHuEPO interruption should be avoided whenever is possible. As a collateral application, the specific changes described herein have potential use for detecting illegal administration of rHuEPO.

Key words: **Erythropoietin withdrawal. Immature reticulocytes. Hemodialysis. Normal rats. Detection of the illegal use of erythropoietin.**

INTRODUCCIÓN

La rHuEPO es el recurso terapéutico más importante aparecido en los últimos 15 años para el tratamiento de la anemia en la enfermedad renal^{1,2}. Durante la práctica diaria con pacientes de HD, hemos observado que la interrupción brusca de la

administración de rHuEPO, una vez conseguidos los valores hematológicos adecuados, lleva a una disminución en los valores de hemoglobina y hematocrito en un espacio de tiempo inesperadamente corto³. Con estos datos, una reducción progresiva de rHuEPO sería preferible frente a la retirada brusca, con el fin de atenuar la mencionada anemizacón.

Sorprendentemente, apenas hay datos previos sobre las bases patofisiológicas de este fenómeno; incluso en el ámbito experimental, la información disponible sobre el patrón eritropoyético tras la interrupción de la terapia con rHuEPO es muy escasa. Es este sentido, Piron y cols.⁴, en un estudio en ratas, determinó que el cese del tratamiento con rHuEPO llevaba asociado una posterior anemia secundaria⁴. El presente estudio se diseñó con el fin de examinar la respuesta a la retirada brusca de rHuEPO en pacientes con enfermedad renal en estadio final, mediante una herramienta sencilla, los índices reticulocíticos. El estudio complementario sobre ratas normales se realizó para comprobar la validez de los hallazgos obtenidos en pacientes urémicos en condiciones no urémicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Protocolo con pacientes

Estudiamos 10 pacientes con enfermedad renal en estadio terminal (hombre/mujer 5/5, edad media $65,7 \pm 3$ años) tratados en los últimos 6 meses, con HD hospitalaria según pautas habituales. Todos ellos presentaban valores de la cinética del hierro dentro del rango aceptado en pacientes en HD, incluyendo saturación de transferrina superior al 20% y ferritina sérica entre 100 y 300 ng/ml. Ninguno presentaba resistencia a la rHuEPO ni patología tumoral o inflamatoria. De manera habitual, todos ellos recibían rHuEPO alfa (iv, dosis media 8.555 ± 802 U/semana, $129,11 \pm$ U/kg/semana, 2 ó 3

veces/semana) para el tratamiento de la anemia, alcanzando niveles de hemoglobina o hematocrito (35% y 11,5 g/dl respectivamente) que permitían la retirada de la rHuEPO. Una vez obtenido el consentimiento escrito, se interrumpió la rHuEPO. Una vez obtenido el consentimiento escrito, se interrumpió la rHuEPO durante 7 días, tras los cuales se reinició su uso a la misma dosis empleada anteriormente (ver esquema en la fig. 1). El estudio se realizó a los días 0, 7 y 14, extrayéndose muestras de sangre al comienzo de la sesión de diálisis y analizándolas mediante el Automated Reticulocyte Analyzer Sysmex R-3500. Las muestras se incubaron con Auramine O y se procesaron en citómetro de flujo convencional, siguiendo las instrucciones del fabricante, previa validación en el Laboratorio de Hematología (Soto y cols., datos sin publicar). Este método permite distinguir tres patrones de fluorescencia: reticulocitos de alta fluorescencia (HFR), de media fluorescencia (MFR) y de baja fluorescencia (LFR). Estos patrones corresponden con el grado de maduración reticulocítica, desde inmaduros (HFR) a intermedios (MFR) y maduros (LFR)⁵.

Protocolo con animales

Para evaluar el posible papel de la uremia en los resultados obtenidos en pacientes, estudiamos 10 ratas Wistar macho tratadas con 200 U/kg de rHuEPO alfa sc dos veces a la semana durante dos semanas; tras este período, a 5 animales se les retiró la rHuEPO mientras que se continuó en los restan-

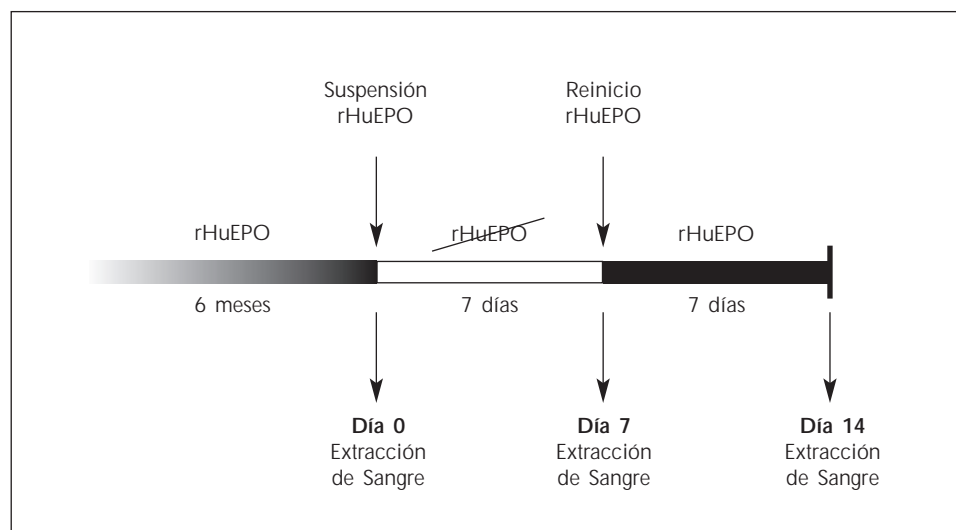


Fig. 1.—Esquema del protocolo seguido en el estudio de los pacientes.

tes durante otra semana más. Las mismas variables determinadas en los pacientes se midieron en las ratas a las 0 y 3 semanas, con excepción de los niveles de eritropoyetina. La dosis de rHuEPO se estableció mediante experimentos previos (100 a 250 U/kg p.c. de rHuEPO). Igualmente, la elección de tres semanas de seguimiento se basó en datos previos del Laboratorio, que indicaron que para inducir cambios significativos en los valores hematológicos, dos semanas de tratamiento con rHuEPO son mejores que una. El uso de animales frente a humanos como control sano se decidió tanto por razones éticas como prácticas.

Medición de eritropoyetina

Los niveles de eritropoyetina se midieron mediante un ELISA comercial (Quantikine IVD Erithropoietin, R & D Systems).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS 10.0 (versión Windows). Una vez examinada la normalidad de la distribución de las variables, se realizaron ANOVA de una entrada, con pruebas de Fisher y Scheffe, o prueba «t» de Student emparejada. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

RESULTADOS

Estudio con pacientes

A los siete días de retirar el tratamiento con rHuEPO, los valores medios de hemoglobina (Hb) y hematocrito (Hct) no se diferenciaban de los valores

basales (día 0) ($12 \pm 0,9$ vs $11,7 \pm 1,0$ g/dl y $37,3 \pm 1,2$ vs $35,8 \pm 0,4\%$, respectivamente, p NS). Sin embargo, tras 7 días del reinicio del tratamiento con rHuEPO, ambas variables habían disminuido respecto a los valores basales ($11,1 \pm 0,8$ y $34,0 \pm 1,6$, ambos $p < 0,02$).

Al mismo tiempo, los mayores cambios se encontraron en la distribución de los distintos subtipos de reticulocitos, como se muestra en la tabla I, donde están ordenados por su grado de maduración (alto, intermedio y bajo respectivamente). A los 7 días de retirar la rHuEPO, se observa una marcada disminución de las formas más inmaduras de reticulocitos ($p < 0,001$), el patrón reticulocítico volvió a valores similares a los basales (p NS) a los 7 días de reiniciar la rHuEPO (tabla I). En la tabla I también se muestran los cambios en el total de reticulocitos; como puede verse, se observa una disminución significativa tras los 7 días de retirada de la rHuEPO. Por el contrario, el total de reticulocitos aumentó sobre el valor basal a los 7 días de restaurar las dosis previas de rHuEPO.

Los niveles de eritropoyetina en el suero fueron $26,0 \pm 2,7$ mU/ml en el momento de cesar la rHuEPO, $10,1 \pm 2$ mU/ml tras los 7 días sin rHuEPO y $24,8 \pm 3,2$ mU/ml a los 7 días de reiniciar el uso de rHuEPO ($p < 0,01$ y NS respecto a los valores iniciales, respectivamente) (el valor de eritropoyetina en suero en una población sana del mismo origen es 5-25 mU/ml).

Estudio con animales

Las diferencias entre el grupo animal y los pacientes respecto a los valores basales fueron evidentes; las ratas mostraban niveles normales de hemoglobina y el porcentaje relativo de formas reticulocíticas presentaba una distribución diferente

Tabla I. Perfil reticulocítico de pacientes en diálisis tras retirada y reinicio de rHuEPO

Forma reticulocítica → Tiempo muestral ↓	LFR (%)	MFR (%)	HFR (%)	Total ret (o/oo)
Basal	$84,2 \pm 1,4$	$13,0 \pm 1,1$	$2,6 \pm 0,4$	$18,2 \pm 0,9$
7 días tras retirada de rHuEPO	$92,7 \pm 1$	$6,6 \pm 0,9^*$	$0,75 \pm 0,2^{**}$	$14,3 \pm 1,2^\#$
7 días tras reinicio de rHuEPO	$84,7 \pm 2,2$	$12,3 \pm 1,4$	$3,0 \pm 1,8$	$23,7 \pm 4,3^*$

$^\#p < 0,05$ respecto a los otros 2 tiempos.

$^*p < 0,02$ respecto a los otros 2 tiempos.

$^{**}p < 0,01$ respecto a los otros 2 tiempos.

LFR, MFR, HFR: Reticulocitos de baja, media y alta fluorescencia.

Ret = Reticulocitos.

Los porcentajes de LFR, MFR y HFR son respecto al total de reticulocitos.

a la observada en los pacientes. Por tanto, no se puede excluir el error sistemático debido a las variaciones interespecíficas, aunque esta circunstancia no debe afectar a la validez de los resultados, ya que se trata de comparaciones seriadas de muestras procedentes de individuos de un grupo genéticamente homogéneo de ratas.

En las ratas, los cambios observados ocurrieron siguiendo un patrón similar al descrito en los pacientes. En la tabla II se muestran los datos basales frente a los obtenidos tras 3 semanas del inicio del tratamiento, tanto en aquellos en los que se retiró la rHuEPO durante la tercera semana como los que mantuvieron este tratamiento a lo largo de todo el experimento (* $p < 0,05$ o ** $p < 0,01$ respecto a las otras condiciones experimentales).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados añaden nuevos datos que pueden resultar útiles para el esclarecimiento de la patogénesis de la anemia producida por la interrupción brusca de rHuEPO en pacientes en HD. Estos pacientes no son capaces de producir la cantidad suficiente de eritropoyetina endógena y muestran resistencia periférica a la rHuEPO. En un estudio animal previo, Piron y cols., mostraban que la actividad eritropoyética, al cesar durante 3 semanas el tratamiento con rHuEPO, se reduce considerablemente⁴. Este grupo sugiere que esto podría representar un agotamiento medular intrínseco de actividad eritropoyética, sobre todo a nivel de células progenitoras⁴. Los resultados aquí reflejados son los primeros de este tipo obtenidos en humanos e identifican un rápido indicador de la depresión eritropoyética, la reducción significativa de las formas más inmaduras de reticulocitos. Además, nuestros resultados ponen de ma-

nifiesto la precocidad —tan solo una semana— de la aparición de alteraciones en la serie eritropoyética.

Aunque en los primeros días tras la interrupción de la rHuEPO no se observaron variaciones en el número de células rojas, nuestros datos reflejan un claro cambio de la regeneración eritropoyética en la médula ósea. Clínicamente, este hallazgo puede considerarse como un presagio de una próxima anemia si el tratamiento con rHuEPO no se reinicia. El hecho de que no se encuentre esta anemia en casos de tratamiento con rHuEPO una vez a la semana⁶ puede estar relacionados con que este proceso anémico podría ser un efecto transitorio no detectable y que acaba controlándose por las sucesivas inyecciones de rHuEPO.

Los resultados obtenidos en el estudio con animales demuestran que los hallazgos sobre el patrón reticulocítico en pacientes son aplicables tanto en condiciones urémicas como no urémicas.

Todos estos resultados, al considerarlos conjuntamente, indican que el ciclo de maduración eritropoyética, estimulado por la rHuEPO exógena, puede verse rápidamente frenado por la incapacidad de producir precursores eritropoyéticos en número suficiente para mantener la población reticulocítica. Este hecho puede requerir la administración continuada de rHuEPO para evitar un descenso en la eritrogénesis.

Una posible segunda aplicación de estos hallazgos sería su uso potencial como marcador indirecto de la interrupción reciente de rHuEPO usada de manera ilegal. Sobre este aspecto, aunque el uso de rHuEPO ha sido prohibido por el Comité Olímpico Internacional y las autoridades deportivas de todo el mundo, no hay disponible actualmente un método que, de manera inequívoca, detecte el abuso de rHuEPO. Se han propuesto distintas y complejas combinaciones de pruebas de laborato-

Tabla II. Perfil reticulocítico de ratas tras retirada y reinicio de rHuEPO

Variable → Tiempo muestral ↓	Hemoglobina (g/100 ml)	Hct (%)	LFR (%)	MFR (%)	HFR (%)	Total ret (o/oo)
Control	14,1 ± 0,4	42,3 ± 1,5	58,8 ± 0,1	28,7 ± 0,1	12,6 ± 0,1	27,3 ± 1,1
rHuEPO, 2 semanas, no rHuEPO, 1 semana	14,9 ± 0,3	43,6 ± 1,1	66,5 ± 3,3*	23,7 ± 2,1*	9,8 ± 1,5**	15,2 ± 1,4**
rHuEPO, 3 semanas	15,4 ± 0,2*	46,5 ± 1,5	57,5 ± 0,9	30,4 ± 0,4	13 ± 0,4	41,6 ± 2,5*

$p < 0,02$ respecto a los otros 2 tiempos.

* $p < 0,01$ respecto a los otros 2 tiempos.

Hct = hematocrito.

LFR, MFR, HFR: Reticulocitos de baja, media y alta fluorescencia.

ret = reticulocitos.

Los porcentajes de LFR, MFR y HFR son respecto al total de reticulocitos.

rio, incluso algunas que emplean parámetros reticulocíticos; sin embargo, hasta donde llega nuestro conocimiento, ninguna de estas pruebas ha analizado los subtipos reticulocíticos⁷⁻⁸. Nuestras observaciones indican que en individuos sanos que han recibido rHuEPO, el patrón reticulocítico tras el cese de su uso podría apoyar, de manera convincente, la existencia de una administración y posterior retirada de la rHuEPO.

En conclusión, la rHuEPO induce un cambio significativo en la patrón de maduración eritropoyética, lo que implica una reducción evidente de las formas más inmaduras de reticulocitos tras el cese de la administración de rHuEPO. La posible consecuencia clínica de estos cambios sería el rápido desarrollo de una anemia grave si no se reinicia el tratamiento con rHuEPO.

Nuestros resultados advierten sobre la retirada brusca de la administración de la rHuEPO en pacientes en diálisis y aconsejan una retirada de un modo más progresivo. En este aspecto y en el referente a la detección del uso ilegal de rHuEPO, nuestros datos son susceptibles de aplicaciones prácticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. European Best Practice Guidelines for the Management of Anaemia in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 14 (Supl. 5): S1-S50, 1999.
2. National Kidney Foundation: K/DOQI Clinical Practice Guidelines for anaemia of chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 37 (Supl. 1): S182-238, 2000.
3. Caramelo C, Jiménez S, Soto C, López MD, De Oña R, Deudero JJP, Llamas P, Neria F: Respuesta reticulocitaria a cese no paulatino de administración de eritropoyetina (EPO). Implicaciones en el tratamiento de la anemia en individuos urémicos. *Nefrología* 23 (Supl. 6): 70, Abstract 269, 2003.
4. Piron M, Loo M, Gothot A, Tassin F, Fillet G, Beguin Y: Cessation of intensive treatment with recombinant human erythropoietin is followed by secondary anaemia. *Blood* 97: 442-448, 2001.
5. Brugnara C: Reticulocyte cellular indices: a new approach in the diagnosis of anaemias and monitoring of erythropoietic function. *Crit Rev Clin Lab Sci* 37: 93-130, 2000.
6. Cheung W, Minton N, Gunawardena K: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of epoetin alfa once weekly and three times weekly. *Eur J Clin Pharmacol* 57: 411-418, 2001.
7. Magnani M, Corsi D, Bianchi M, Paiardini M, Galluzzi L, Gargiullo E, Parisi A, Pigozzi F: Identification of blood erythroid markers useful in revealing erythropoietin abuse in athletes. *Blood Cells Mol Dis* 27: 559-571, 2001.
8. Audran M, Gareau R, Matecki S, Durand F, Chenard C, Sicart MT, Marion B, Bressolle F: Effects of erythropoietin administration in training athletes and possible indirect detection in doping control. *Med Sci Sports Exerc* 31: 639-645, 1999.



Papel del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en la protección de las células endoteliales

F. R. González-Pacheco, M. A. Castilla, M. V. Álvarez-Arroyo, J. J. P. Deudero, F. Neria, A. J. de Solís, S. Yagüe y C. Caramelo

Laboratorio de Nefrología e Hipertensión. Clínica de la Concepción. Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica (IRSIN). Madrid.

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) se ha situado como el principal de los factores angiogénicos, por su potencia y su implicación en múltiples mecanismos.

VEGF: Un único gen para VEGF-A (región cromosómica 6p21.3) da lugar, por «splicing» alternativo del ARNm, a cinco isoformas distintas que corresponden a proteínas de 121, 145, 165, 189 y 206 aa¹. Se han identificado otras moléculas estructuralmente relacionadas con el VEGF y que se unen a sus mismos receptores, como PLGF (Factor de crecimiento placentario), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el homólogo viral de VEGF, VEGF-E.

El VEGF₁₆₅, de solubilidad y afinidad por la matriz extracelular intermedias entre el VEGF₁₂₁ y el VEGF₁₈₉, es la isoforma más abundante, y es producido por una gran cantidad de tipos celulares². Estructuralmente, el VEGF₁₆₅ es una glicoproteína homodímera de 45 KDa, básica y con dominios de unión a heparina, siendo por lo tanto en parte soluble y en parte retenida en la superficie celular y matriz extracelular.

La tensión de oxígeno tiene un papel crítico en la regulación de la expresión génica del VEGF. El factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1) se ha identificado como el regulador principal de la respuesta transcripcional debida a hipoxia³, aunque otros factores de transcripción, como AP-1, SP-1 y NFκB, tienen sitios de unión en la región del promotor de VEGF⁴. Además, hay citoquinas y alteraciones oncogénicas que pueden activar la expresión de VEGF, como por ejemplo, mutaciones del gen *ras*, la inactivación del gen supresor de tumores von Hippel-Lindau, o mutaciones en el gen supresor de tumores *p53*.

El VEGF se une, al menos, a tres receptores de tipo tirosina quinasa y a una proteína de membrana llamada neuropilina. Los 3 receptores se denominan VEGFR1 (Flt-1), VEGFR2 (KDR/Flk-1) y VEGFR3 (Flt-4). Los dos primeros se encuentran en el endotelio vascular y el último se expresa exclusivamente en vasos linfáticos. La señal de VEGF transmitida a través de estos receptores es capaz de fos-

forilar al menos 11 proteínas en células endoteliales (CE)¹. El VEGFR1 presenta una respuesta débil de fosforilación y aparentemente media señales que regulan la migración celular. La interacción del VEGF con el VEGFR2 activa proliferación, migración, supervivencia y reorganización del citoesqueleto en CE. Además, el VEGF no sólo activa un programa de proliferación en el endotelio, también pone en marcha propiedades citoprotectoras, descritas hasta ahora en capilares en desarrollo, con un papel crítico de la vía PI3K/Akt. Esta propiedad es fundamental

en múltiples situaciones, incluyendo entre otras isquemia/reperfusión, neoplasia, inflamación, perfusión de órganos destinados al trasplante, shock y reendotelización de superficies denudadas. Trabajos recientemente finalizados y en curso de nuestro Laboratorio y de otros grupos, han revelado nuevas propiedades relacionadas con el VEGF.

VEGF y regulación de HIF-1 y NFκB: El VEGF, así como otros factores de crecimiento (por ej IGF-1) es un regulador positivo de la expresión de factores transcripcionales como HIF-1 y NFκB. Estos datos indican la existencia de respuestas de retroalimentación entre el producto del gen de VEGF y sus propias señales de transcripción.

VEGF y ciclosporina A (CsA): El VEGF tiene un importante papel en la protección celular ante la toxicidad inducida por CsA. Este efecto abarca no solo a CE⁵, sino también a células tubulares renales⁶. En términos más generales, el VEGF puede ser un elemento clave en la protección renal ante diversos tipos de agresiones⁷.

VEGF y tumores: El VEGF-A es considerado el principal factor angiogénico tumoral, actuando en conjunto con otras moléculas relacionadas, como el VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PLGF que, siendo menos potentes, tienen la capacidad de activar sus mismos receptores. Además, algunas de estas moléculas, como el VEGF-C y el VEGF-D, no solo promueven angiogénesis del endotelio normal, sino también del linfático, afectando doblemente a la

diseminación del tumor. En el último año, hemos visto que el medio condicionado de células tumorales posee efectos citoprotectores, activadores y fenotípicos sobre las CE, que están mediados en una parte importante por VEGF. De interés especial, el bloqueo de VEGF desencadena una respuesta de muerte celular endotelial más intensa, aportando un nuevo elemento de interpretación para los efectos antiangiogénicos del antagonismo de VEGF.

Una visión colectiva de los resultados enunciados indica que el VEGF cumple un papel singular en la unificación de señales citoprotectoras en CE en situación quiescente y, por lo tanto, análoga a la que existe en la pared vascular normal. Aunque predecible, la coordinación de los diferentes mecanismos expuestos constituye el trasfondo de una respuesta que, aunque posee una serie de elementos comunes, es flexible y diferenciada para cada tipo diferente de agresión. Basados también en los datos presentes, debemos resaltar la notable complejidad de la respuesta citoprotectora en un tipo de células que, como las endoteliales, se encuentran en una situación anatómica particularmente accesible a la agresión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferrara N: Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 77: 527-543, 1999.
2. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5: 1806-1814, 1991.
3. Wang GL, Semenza GL: Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J Biol Chem* 268: 21513-21518, 1993.
4. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266: 11947-11954, 1991.
5. Álvarez-Arroyo MV, Yagüe S, Wenger RM, Pereira DS, Jiménez S, González-Pacheco FR, Castilla MA, Deudero JJ, Caramelo C: Cyclophilin-mediated pathways in the effect of cyclosporin A on endothelial cells: role of vascular endothelial growth factor. *Circ Res* 91: 202-209, 2002.
6. Álvarez Arroyo MV, Suzuki Y, Yagüe S, Lorz C, Jiménez S, Soto C, Barat A, Belda E, González-Pacheco FR, Deudero JJ, Castilla MA, Egido J, Ortiz A, Caramelo C: Role of endogenous vascular endothelial growth factor in tubular cell protection against acute cyclosporine toxicity. *Transplantation* 74: 1618-1624, 2002.
7. Caramelo C, Álvarez-Arroyo MV, Yagüe S, Suzuki Y, Castilla MA, Velasco L, González-Pacheco FR, Tejedor A: Cyclosporin A toxicity, and more: vascular endothelial growth factor (VEGF) steps forward. *Nephrol Dial Transplant* (in press), 2003.

RESPUESTA A LA HIPOXIA.

UN MECANISMO SISTEMICO BASADO EN EL CONTROL DE LA EXPRESION GENICA

**CARLOS CAMELO, JUAN J. PEÑA DEUDERO, ANGELES CASTILLA, SOLEDAD JUSTO,
ALAIN J. DE SOLIS, FERNANDO NERIA, SILVIA PEÑATE, FRANCISCO R. GONZALEZ-PACHECO**

*Laboratorio de Nefrología e Hipertensión, Instituto de Investigaciones Médicas,
Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid*

Resumen La respuesta hipóxica, sobre la que se dispone de nuevos datos críticamente importantes, puede esquematizarse en tres sistemas, *vg.* de detección o sensor de oxígeno, de regulación, que controla la expresión génica y efector. El elemento principal de organización del sistema regulador es un factor de transcripción específico, el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). En presencia de oxígeno, la subunidad α del HIF-1 (HIF-1 α) se modifica por las hidroxilasas, que constituyen el punto central del mecanismo sensor, induciendo su catabolismo por el proteosoma. Por el contrario, en hipoxia, o en presencia de algunos factores de crecimiento que incrementan su síntesis, el HIF-1 α se transloca al núcleo, donde, unido al HIF-1 β , actúa como factor transcripcional de genes con elementos de respuesta hipóxica (HRE) en su promotor. Estos regulan la síntesis de una amplia serie de proteínas, que abarcan desde enzimas respiratorias y transportadores hasta hormonas involucradas en la regulación a escala del organismo de la circulación y la eritropoyesis. El papel del HIF-1 no se restringe a la mera inducción de una respuesta adaptativa a la falta de oxígeno, sino que participa significativamente en los mecanismos de reparación celular. Una simple lista de algunas alteraciones de importancia fisiopatológica, tanto estimuladoras como inhibitorias, que involucran al sistema de HIF-1, incluiría: enfermedad pulmonar crónica, adaptación al tabaco/humo, anemia/hemorragia, isquemia/reperfusión, crecimiento, vascularización y resistencia celular de los tumores, preeclampsia y crecimiento intrauterino retardado, hiper o hipovascularización retiniana, sobredosis de fármacos, enfermedad inflamatoria intestinal y curación de heridas. Esta sola enumeración ilustra la importancia de este mecanismo.

Palabras clave: hipoxia, HIF-1, sensor de oxígeno, VEGF, eritropoyetina

Abstract *Response to hypoxia. A systemic mechanism based on the control of gene expression.* New, critically important data have been recently generated about the response to hypoxia. This response can be schematized in three main systems or functions, *ie.* detectional or oxygen sensing, regulatory, which controls gene expression and effector. The principal organizer of the regulatory branch is a specific transcription factor, the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). In the presence of oxygen, the α subunit of HIF-1 (HIF-1 α) is modified by hydroxylases, that represent the central point of the oxygen sensing mechanism. This type of hydroxylation induces HIF-1 α catabolism by the proteasome. On the contrary, in hypoxia, or in the presence of certain growth factors that increase HIF-1 α synthesis, HIF-1 α translocates to the nucleus, where it binds HIF-1 β , and thence acts on transcription of genes carrying hypoxia responsive elements (HRE) on their promoters. These genes regulate the synthesis of an ample series of proteins, which span from respiratory enzymes and transporters to hormones regulating circulation and erythropoiesis. The role of HIF-1 α is not restricted to the mere induction of adaptation to decreased oxygen: instead, it significantly participates in cell repairing mechanisms. A simple list of some of the stimulatory or inhibitory alterations of pathophysiological importance involving the HIF-1 system, would include: chronic lung disease, smoking adaptation, anemia/hemorrhage, ischemia/reperfusion, growth, vascularization and cell resistance of tumors, preeclampsia and intrauterine growth retardation, retinal hyper or hypovascularization, drug intoxications, bowel inflammatory disease and wound repair. This list illustrates by itself the importance of the mechanism herein reviewed.

Key words: hypoxia, HIF-1, oxygen sensor, VEGF, erythropoietin

La fisiopatología es un territorio de límites imprecisos, que tiene como denominador común la adaptación a la enfermedad de mecanismos que, en su origen, se desarrollaron para responder a situaciones de especial exigencia en individuos sanos. Así, entre otras, el organismo enfermo emplea respuestas sistémicas primarias ante la agresión, como las que se desencadenan ante la pérdida de sangre, la infección, los traumatismos, la deshidratación, el ayuno, o la hipoxia, para hacer frente a situaciones patológicas. Estas últimas, especialmente las crónicas, son sustancialmente diferentes de la condición original a la que se aplica el mecanismo de respuesta. Valgan como ejemplos característicos de esta dualidad los siguientes: uno, la estimulación del eje renina-angiotensina-aldosterona incluye aspectos inflamatorios y promotores de la cicatrización vascular, que son útiles en el caso de la herida de un vaso, pero resultan deletéreos en la arteriosclerosis crónica; otro, el remodelado vascular pulmonar inducido por la hipoxia es necesario y favorable en la adaptación fisiológica a la altitud, pero actúa negativamente en un paciente con enfermedad pulmonar crónica. La hipoxia es un prototipo considerablemente bien estudiado y un paradigma de respuestas que involucran al organismo en su conjunto y pueden tener consecuencias diferentes en la salud y en la enfermedad.

Hipoxia: Una pregunta inmediata a realizarse es qué condiciones fisiopatológicas se asocian con hipoxia. Existe hipoxia transitoria durante el ejercicio, en sepsis o en tejidos traumatizados e hipoxia crónica en la altura o en zonas tisulares menos oxigenadas, como por ejemplo la médula renal. Ya en el terreno de la patología, hay hipoxia en la enfermedad pulmonar, la insuficiencia cardíaca, la isquemia tisular, la anemia y en los tejidos tumorales.

La respuesta a la hipoxia puede esquematizarse en tres sistemas: a) de detección o sensor de oxígeno, b) de regulación, mediante el control de la expresión de una amplia serie de genes, y c) efector múltiple, que incluye no sólo expresión de genes, sino múltiples cambios funcionales, que van desde la estimulación de moléculas vasodilatadoras hasta las variaciones en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. El sistema regulador está modulado directamente por el sensor y el elemento organizador principal es un factor de transcripción específico, el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). La presente revisión se centra específicamente en este factor.

Respuesta a la hipoxia: La diferencia entre los tejidos y órganos no proviene de su dotación génica, sino de la manifestación particular de los genes en cada tipo celular. En este contexto, los factores de transcripción actúan para orientar y adaptar, o dicho más gráficamente, reclutar la expresión génica hacia patrones determinados de respuesta, como por ejemplo la supervivencia, la migración, la proliferación o el crecimiento.

La respuesta a la hipoxia requiere un alto nivel de coordinación. Su mecanismo incluye un espectro de cambios que van desde variaciones en la expresión enzimática que adaptan la producción de energía frente a una menor disponibilidad de oxígeno, hasta la puesta en marcha de fenómenos de autoeliminación de la célula ante la imposibilidad de sobrevivir en circunstancias adversas extremas. Todos los organismos, desde las bacterias hasta los humanos, poseen mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno, que son esenciales para la producción energética y por lo tanto para la supervivencia. En los mamíferos superiores, la respuesta a la hipoxia es compleja, e incluye, entre otras, adaptaciones de la función respiratoria y hemodinámica, del metabolismo intermedio y de la función renal. Estas adaptaciones se manifiestan en cambios hormonales, de mediadores y de actividad enzimática, e implican variaciones en la expresión de una serie de genes entre los que destacaremos el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la eritropoyetina (EPO).

El incremento en la expresión de VEGF en condiciones de hipoxia ocurre a través de mecanismos moleculares de aumento de transcripción¹ y/o estabilización del ARNm². La regulación transcripcional del VEGF en condiciones de hipoxia está mediada por la unión de HIF-1 a secuencias específicas localizadas en el promotor del VEGF (HIF-1 *binding sites* – HBSS o *hypoxia responsive elements*, HREs), constituida por las bases: -RCGTG³. La regulación de la expresión de EPO es similar a la referida para VEGF en lo que concierne al papel del HIF-1, pero diferente en cuanto a otros elementos co-reguladores con efectos sobre el promotor.

El factor inducible por hipoxia (HIF-1): HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos sub-unidades (HIF-1 α y HIF-1 β) con pesos moleculares aparentes de 120-130 kD y 91-94 kD⁴, respectivamente. Ambas sub-unidades comparten cierta homología en sus extremos N-terminales, conteniendo un dominio bHLH (*basic helix-loop-helix*) y un dominio PAS (Per-Arnt-Sim), que están involucrados en la dimerización y en la unión al ADN⁵. El extremo COOH-terminal de la sub-unidad α contiene dos dominios de transactivación (TADs) y un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), siendo éstos los responsables de las funciones transactivadora y reguladora de este factor en diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno⁶. HIF-1 β es idéntico al ARNT –translocador nuclear del receptor Ah (aril hydrocarbon)–. Esta proteína dimeriza con receptores Ah activados cuyos ligandos constituyen diferentes contaminantes ambientales, como aminas heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos y compuestos aromáticos (dioxinas, dibenzofuranos y bifenilos)⁷. La identificación de ARNT como sub-unidad de HIF-1 demostró por vez primera que ARNT (HIF-1 β) constituye una sub-unidad común de varios

heterodímeros que contienen dominios bHLH. La translocación al núcleo de HIF-1 α y heterodimerización con HIF-1 β son necesarias para la unión de HIF-1 a los HBSs y su consiguiente transactivación.

El descubrimiento de HIF-1 como factor regulador de la homeostasis del O₂ surgió como consecuencia del estudio de los mecanismos moleculares que modulaban la transcripción de la EPO en respuesta a la hipoxia³. La caracterización de los niveles de expresión de HIF-1 α y HIF-1 β , se evaluó inicialmente en células Hep3B y HeLa bajo diferentes condiciones de disponibilidad de O₂—hipoxia, normoxia y re-oxigenación—⁸. De manera general el ARNm de ambas sub-unidades se expresaba constitutivamente bajo cualquier condición. Sin embargo, la proteína de HIF-1 α sólo era detectable en hipoxia.

En presencia de oxígeno, HIF-1 α sufre modificaciones post-traduccionales por parte de hidroxilasas (PHD1-3, FIH-1), las cuales hidroxilan residuos de Pro^{402/564} y de Asn⁸⁰³ que se localizan en los dominios ODD y TADs, respectivamente^{9, 10}. Estas modificaciones permiten la unión de la proteína VHL (von Hippel Lindau) a los sitios hidroxilados de HIF-1 α formando parte del complejo E3 ubiquitin-ligasa, provocando así su ubiquitinación y degradación¹¹. La hidroxilación del residuo Asn⁸⁰³ se ha descrito recientemente y constituye un impedimento estérico en la unión del co-activador CBP/p300 a HIF-1 α , necesario para la transactivación de HIF-1¹⁰. En ausencia de oxígeno, HIF-1 α es fosforilado y translocado al núcleo, donde dimeriza con HIF-1 β y se acopla a su co-activador CBP/p300, permitiendo la transactivación e inducción de genes (Fig. 1). Es importante también, aunque está menos caracterizada, la unión de HIF-1 a proteínas de estrés (HSPs)¹². Esta unión protege a HIF-1 de la degradación. En este sentido, el efecto pro-degradativo de HIF-1 de agentes del tipo de las ansamicinas, bloqueantes de HSP90, abre una posibilidad de interés en el campo terapéutico de la antiangiogénesis¹³.

El sensor de oxígeno: Desde hace décadas, se ha trabajado en la identificación del sensor de oxígeno, en general bajo el supuesto de que se trataría de una proteína con un grupo hemo o similar¹⁴. En los últimos años, se han hecho avances notables en el conocimiento del mecanismo de este sensor, basadas en su propiedad de activar la señalización vía HIF-1. Existen varios modelos que involucran a diferentes moléculas como responsables de dicha función; entre ellas es fundamental un tipo especial de hidroxilasas (PHDs) que utilizan 2-cetoglutarato como sustrato, y que al ser reguladas por oxígeno, cumplen todas las premisas para ser consideradas como el sensor principal de oxígeno. En la estructura de estas proteínas es característico un grupo prostético de tipo hemo, en el cual el Fe²⁺ puede ser sustituido por otros metales (Co²⁺, Ni²⁺) causando un bloqueo en la capacidad hidroxilasa de la enzima y por lo tanto una inhibición de la degradación de HIF-1 α ¹⁵. Un segundo tipo

de regulación atribuye a las especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente el superóxido (O₂⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), un papel modulador importante. Este papel se ejerce de dos maneras distintas. En un caso, la enzima NADPH oxidasa (O₂ → O₂⁻) es la responsable de la producción de ROS, que en condiciones de normoxia inducen la degradación de HIF-1 α . Una segunda situación señala que la producción de ROS en la mitocondria (cyt c1 → O₂⁻ → H₂O₂) en condiciones de hipoxia induce la estabilización de HIF-1 α ¹⁶. Los mecanismos celulares de ambas formas de regulación están aún pendientes de resolver.

Otras vías de estimulación de HIF-1: La hipoxia no es el único estímulo que incrementa los niveles de HIF-1 α . En condiciones de normoxia muchas citoquinas y factores de crecimiento activadores de receptores del tipo tirosina quinasa (RTKs) son también capaces de inducir HIF-1 α , repercutiendo sobre un incremento en los niveles de este factor transcripcional. Entre éstos se incluyen: insulina¹⁷, factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2)¹⁸, interleuquina-1 β (IL-1 β)¹⁹, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)¹⁹, factor de crecimiento epidérmico (EGF)²⁰, trombina²¹, endotelina 1 (ET-1)²² y heregulina (HER2)²³. De manera general, el mecanismo por el cual todos ellos inducen HIF-1 α incluye un incremento en la síntesis de la proteína, a diferencia de lo que ocurre en hipoxia, en la que la estabilidad del factor está asociada a una disminución en su tasa de degradación. Las vías principales de señalización descritas hasta el momento que participan en la inducción de HIF-1 α a partir de estos factores de crecimiento, incluyen PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa), Akt (PKB), Ras, MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), y MEK (quinasa de MAPK) (Fig. 2). En el corriente año académico, y en el curso de trabajos enfocados al efecto del estrés oxidativo sobre las células endoteliales, hemos obtenido resultados que sugieren la existencia de una vía de retroalimentación del VEGF sobre su propio factor de transcripción principal, el HIF-1^{24, 25}. Un aspecto novedoso adicional de esta vía es el papel del anión superóxido como mediador principal de transmisión de la señal activadora. En cuanto al posible significado funcional de esta vía, pueden postularse la sensibilización a la respuesta hipóxica a través de uno de sus productos intermedios y la amplificación de los efectos de factores de crecimiento a través del reclutamiento de genes dependientes de HIF-1. En este último sentido, puede considerarse, por ejemplo, que el efecto inductor de HIF-1 sobre las vías glucolíticas puede ser crítico a la hora de la oferta de energía y metabolitos intermediarios necesarios para la proliferación.

Expresión génica en la hipoxia: Tal como hemos mencionado, la respuesta a la hipoxia es integral, y abarca todos los aspectos necesarios para proveer oxígeno a los tejidos y conseguir su aprovechamiento más eficaz.

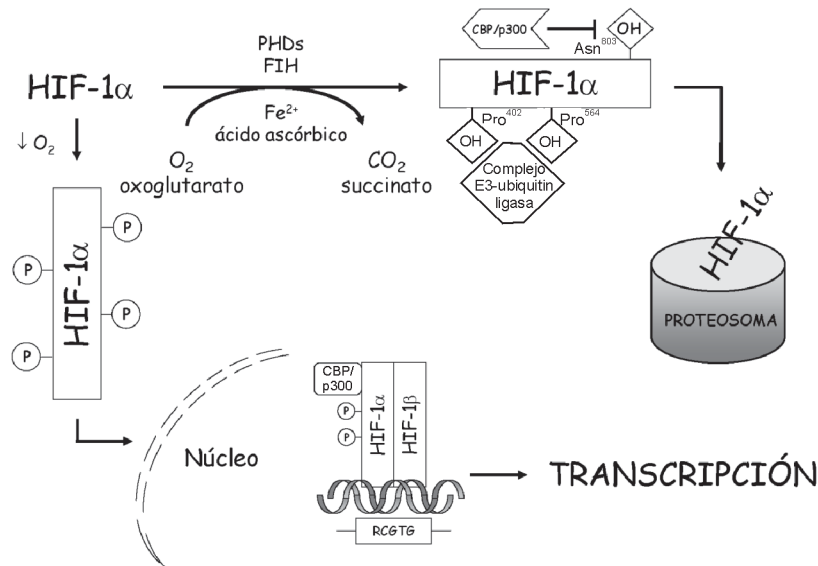


Fig. 1.— Ciclo de activación-degradación de HIF-1 α . A la izquierda se muestra el funcionamiento en hipoxia y a la derecha en normoxia. Abreviaturas: **Asn**, asparagina; **CBP/p300**, complejo coactivador transcripcional CREB-binding protein/p300; **FIH**, factor inhibidor de HIF; **HIF-1 α** , subunidad α del factor inducible por hipoxia; **OH**, sitios de hidroxilación; **P**, sitios de fosforilación; **PHDs**, prolin hidroxilasas; **Pro**, prolina.

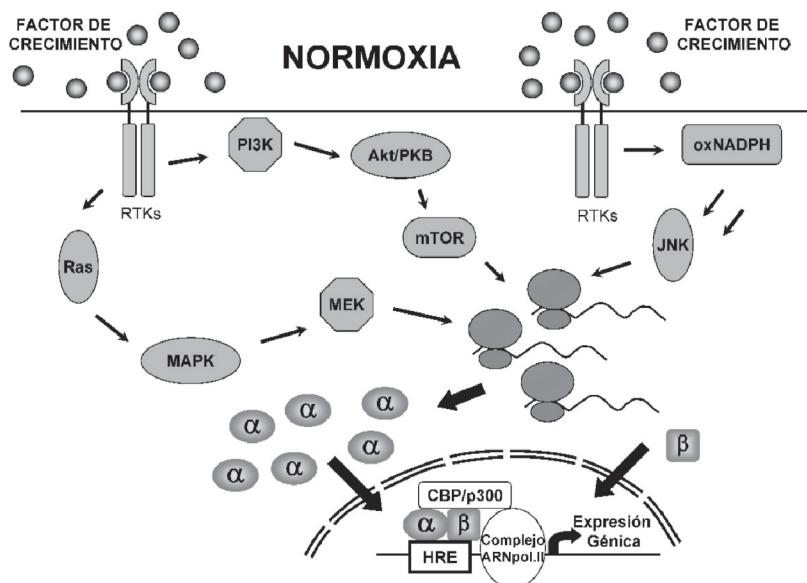


Fig. 2.— Mecanismo común de inducción de HIF-1 α por citoquinas y/o factores de crecimiento. Abreviaturas: **Akt/PKB**, proteína quinasa B; **CBP/p300**, CREB-binding protein/p300; **HRE**, hipoxia-responsive element; **JNK**, c-jun N-terminal kinase; **MAPK**, mitogen-activated protein kinase; **MEK**, MAPK kinase; **mTOR**, mammalian target of rapamycin; **oxNADPH**, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; **PI3K**, phosphatidylinositol 3-OH kinase; **Ras**, small G protein; α , subunidad α del factor inducible por hipoxia; β , subunidad β del factor inducible por hipoxia.

En la actualidad, la identificación de genes que se activan por HIF-1 se ha incrementado considerablemente, incluyendo muchos cuyas proteínas participan en múltiples funciones celulares dirigidas a favorecer la oxi-

genación tisular, entre otras, angiogénesis, metabolismo energético, eritropoyesis, proliferación y viabilidad celular, remodelado vascular y apoptosis. La Figura 3 esquematiza los genes que se ponen en marcha a tra-

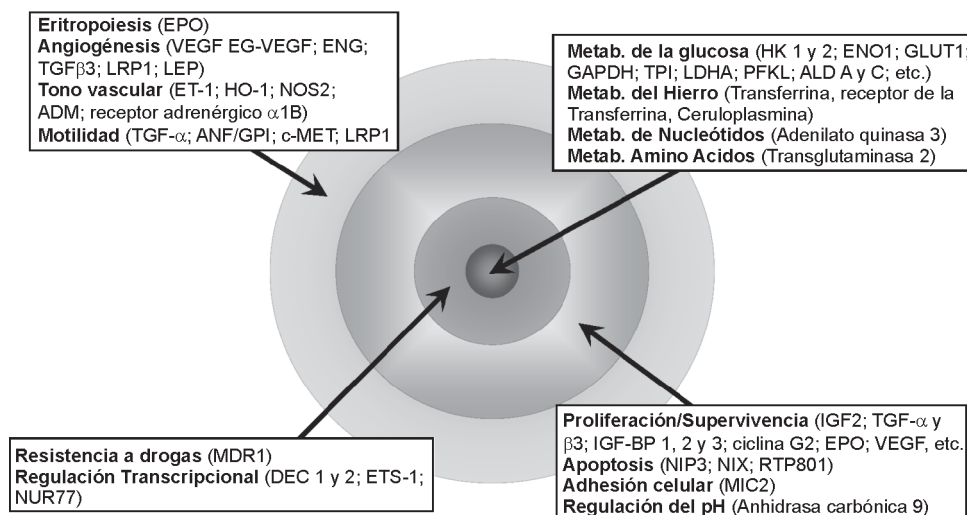


Fig. 3.— Genes transactivados por HIF-1. La distribución concéntrica se ha empleado a los fines de visualizar la participación de genes ligados a adaptaciones celulares esenciales a la hipoxia (centro) y mecanismos con diferente grado de integración sistémica (periferia). Abreviaturas: **ADM**, adrenomedullin; **ALD A y C**, aldolase A and C; **EG-VEGF**, endocrine-gland-derived VEGF; **ENG**, endoglin; **ET1**, endothelin 1; **ENO1**, enolase 1; **EPO**, erythropoietin; **GLUT1**, glucose transporter 1; **GAPDH**, glyceraldehyde-3-p-dehydrogenase; **HK 1 y 2**, hexokinase 1 and 2; **IGF2**, insulin-like growth factor 2; **IGF-BP 1, 2 y 3**, IGF-factor-binding-protein 1, 2 and 3; **LDHA**, lactate dehydrogenase A; **LEP**, leptin; **LRP1**, LDL-receptor-related protein 1; **MDR1**, multidrug resistance 1; **NOS2**, nitric oxide synthase 2; **PFKL**, phosphofructokinase; **TGF-α**, transforming growth factor-α; **TGF-β3**, transforming growth factor-β3; **TPI**, triosephosphate isomerase, **VEGF**, vascular endothelial growth factor.

vés de HIF-1. La inducción vía HIF-1 afecta a factores de citoprotección, destinados a amortiguar el daño hipóxico^{1, 26} y enzimas glucolíticas^{27, 28} y de transporte de hexosas²⁹, necesarias para la adaptación metabólica inmediata y producción de ATP por vías anaerobias; también, se activan genes de mediadores hemodinámicos^{22, 30}, destinados a mantener la perfusión tisular; a nivel de organismo, se inducen genes de más largo alcance e integradores, enfocados a la angiogénesis^{1, 31}, al trofismo vascular²⁶ y a la producción de transportadores de oxígeno, incluyendo hematies^{8, 32}. Un dato importante de interpretación es que, si bien el HIF-1 ejerce el papel principal en la inducción de estos genes, necesita elementos co-reguladores, cuyos sitios de unión al promotor se distribuyen en el flanco del HRE donde se une el HIF-1, incrementando su respuesta e incluso haciendo posible la transcripción, que no ocurre en su ausencia. Un ejemplo típico de esta circunstancia es el estímulo por hipoxia de la expresión del gen de ET-1, que necesita de la acción mancomunada de HIF-1, AP-1, GATA-2, y CAAT-binding factor (NF-1)³³.

HIF-1, hipoxia y citoprotección: Sintetizando estos apartados, la respuesta de HIF-1 es específica de la hipoxia y del estímulo por factores de crecimiento. Esta última vía se relaciona con la necesidad de proveer una

mayor oferta de oxígeno en tejidos en expansión celular. En este punto cabe preguntarse si la célula responde a la depleción energética de forma idéntica a la falta de oxígeno. Los datos disponibles, si bien todavía insuficientes, indican que el déficit de ATP, que podría ser interpretado como un equivalente de hipoxia, no parece estimular la activación de HIF-1, aunque sí en cambio la de HSPs^{34, 35}. De interés adicional, en modelos experimentales en células tubulares renales (LLC-PK1), la hipoxia no extrema no causa depleción de ATP, un dato que refleja la eficiente adaptación de la producción energética ante la disminución de oxígeno³⁴. No se han publicado aún estudios similares en modelos con bloqueo de HIF-1, pero su interés es obvio, ya que es probable que HIF-1 sea en gran parte responsable de la citada eficiencia.

Estos datos se relacionan con el apartado final, referido a posibilidades terapéuticas. En breve, las acciones citoprotectoras abarcan a muchos tipos celulares y respuestas sistémicas. En este contexto, HIF-1 es un factor transcripcional clave en una respuesta génica compleja, desarrollada a múltiples niveles. A modo de ejemplos, en experimentos en ratón, se ha observado que episodios breves de hipoxia intermitente bastan para inducir la producción de EPO, que a su vez protege al corazón

del daño apoptótico por isquemia-reperfusión; por el contrario, en animales que no expresan HIF-1, esta respuesta no ocurre, no estimulándose la producción de EPO con la hipoxia³⁶. En diferentes tipos tumorales, HIF-1 se encuentra marcadamente activado, y este estado se relaciona con mayor agresividad del tumor. Más aún, otra posible explicación, más indirecta, de los efectos de HIF-1 sobre los tumores proviene de datos recientes, que demuestran una elevación de HIF-1, con efectos protectores, en las células endoteliales de tumores irradiados, lo que aporta un nuevo abordaje de interpretación a los posibles mecanismos de resistencia tumoral a la radioterapia³⁷.

Aspectos clínicos: La expresión de HIF-1 y los genes que regula, se han relacionado con múltiples circunstancias ambientales y fisiológicas (altura, ejercicio, frío, exposición al tabaco), como procesos patológicos. Hemos seleccionado algunas situaciones de interés inmediato.

Enfermedad pulmonar crónica: En un ejemplo de adaptación fisiológica, en la altura se ha observado un aumento de expresión de HIF-1 tanto en nativos aclimatados crónicamente como en viajeros; este aumento se acompaña de incremento de EPO y cambios en el músculo esquelético, y especialmente en el número y actividad de mitocondrias³⁸. Este aumento de HIF-1, que es útil para incrementar la capacidad transportadora de oxígeno, se acompaña de estimulación de mecanismos de remodelado de la vasculatura, que llevan a mayor hipertensión pulmonar. La hipoxia es un potente estímulo para la producción por el endotelio pulmonar de ET-1, un péptido capaz de inducir vasoconstricción y proliferación del músculo liso de los vasos pulmonares y VEGF, un agente proliferativo y remodelante; ambos genes están relacionados con HIF-1. En contrapartida fisiológica, ET-1 aumenta en la altitud de forma inversamente proporcional a la saturación arterial de oxígeno y de manera directamente proporcional con el aumento en la presión sistólica de la arteria pulmonar³⁹. Es de interés el estudio del papel de genes dependientes de HIF-1 en otros mecanismos relacionados con la hipertensión pulmonar, como la inhibición del canal de potasio en los vasos pulmonares, así como en la activación local de angiotensina II³⁹. En la misma línea de evidencia, el síndrome de apnea obstructiva del sueño se acompaña de niveles elevados de VEGF en sangre, en proporción al grado de hipoxia; este dato proporciona una pista en la dirección de un posible incremento de HIF-1 y por consiguiente de otros genes potencialmente relevantes⁴⁰.

El sistema de HIF-1 participa de la adaptación al ejercicio, y especialmente de los cambios hipóxicos relacionados con el mismo, favoreciendo el paso de la glucólisis aerobia a la anaerobia. En este sentido, en animales a los que se ha eliminado HIF-1, se observa ausencia de acumulación de ácido láctico durante el ejercicio, con disminución de la fatigabilidad y consiguiente uso mus-

cular excesivo y daño similar al encontrado en las distrofias musculares con alteración de la vía glucolítica⁴¹. De interés especial, la glucólisis anaerobia mantiene los niveles de ATP a pesar de la ausencia de producción aerobia de energía. Este fenómeno es especialmente importante en la isquemia/reperfusión, y depende de HIF-1 y sus genes relacionados.

Patología tumoral: El crecimiento rápido de los tumores determina que su incremento de tamaño no se acompañe de un desarrollo vascular suficiente, lo que genera zonas de hipoxia en el interior de la masa tumoral. Esta hipoxia activa HIF-1 y éste a su vez pone en marcha toda la familia de genes angiogénicos⁴², aumentando la densidad y permeabilidad vascular, y por tanto el crecimiento y propagación del tumor y, de gran interés, en algunos casos la resistencia del mismo al tratamiento. Independientemente de la hipoxia, en algunos tumores, como hemangioblastomas y carcinomas renales, la activación de HIF-1 se relaciona con la inactivación funcional del gen supresor VHL, lo que disminuye la degradación y aumenta el HIF-1, aun en normoxia^{43, 44}. Además, el hallazgo reciente de niveles altos de HIF-1 en neoplasias como la leucemia aguda linfática, en la que no existe aparentemente hipoxia, sugiere que la explicación del aumento debe ser más compleja⁴⁵.

Si bien el incremento de HIF-1 en los tumores es un hecho demostrado, no se han desarrollado aún abordajes terapéuticos basados en su bloqueo específico. Ahondando un poco más, se desconocen las causas de por qué, dentro de todos los genes dependientes de HIF-1, solo se expresan con mayor intensidad algunos, un fenómeno que debe estudiarse y que se relaciona con la presencia de sitios co-reguladores de los efectos de la unión del HIF-1 al HRE. Un aspecto de interés extremo es el posible papel de HIF-1 en la particular adaptación metabólica de los tumores, en los que la glucólisis anaerobia no se inhibe en presencia de formación de ATP por vía aeróbica; esta situación puede relacionarse en forma directa con el efecto protector del HIF-1 sobre las células tumorales.

Shock hemorrágico: En el shock hemorrágico, el HIF-1 se activa a nivel tisular, pero la información disponible es todavía muy fragmentaria. En este tipo de shock existe inducción de óxido nítrico sintasa (NOS), ciclooxigenasa 2 (COX-2) y CD14, lo que aumenta la producción de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas. HIF-1 regula la inducción de NOS durante la fase isquémica de este shock^{46, 47}.

Anemia y eritropoyetina: HIF-1 es esencial en la inducción fisiológica del gen de EPO. Viendo esta relación desde el punto de vista del mecanismo global desarrollado anteriormente, es notable que HIF-1 actúe sobre al menos tres genes de importancia en cuanto al efecto de la EPO: el de la transferrina, necesario para la oferta de hierro a las células eritroides, el del VEGF, cofactor en la estimulación de estas mismas células y el de la NOS2, necesario para la producción de NO, que permite el

mantenimiento de cifras normales de presión arterial durante el efecto de la EPO, hasta el punto en que en ratones transgénicos para EPO humana, la inhibición de NOS provoca la muerte por complicaciones masivas cardiovasculares⁴⁸.

En patología, individuos con mutaciones estimuladoras de HIF-1 presentan policitemia familiar; del mismo modo, la eritrocitosis paraneoplásica se ha asociado a mutaciones del gen VHL que afectan su interacción con HIF-1⁴⁹. De especial interés, la EPO no solo tiene funciones como regulador de la eritropoyesis, sino que participa en diferentes mecanismos, entre otros la vascularización retiniana y de la glándula mamaria, diferenciación de adipocitos, maduración embrionaria de la cresta neural, citoprotección neuronal, de miocardiocitos y de túbulo renales en situaciones de isquemia/reperfusión⁵⁰.

El mecanismo exacto por el cual aumenta la EPO en la anemia humana no se ha dilucidado por completo; por ejemplo, en las Unidades de Cuidados Intensivos, los niveles de EPO pueden ser inapropiadamente bajos para el grado de anemia; las razones no se conocen suficientemente, pero la insuficiencia renal es probablemente un elemento significativo. En nuestro conocimiento, se carece de estudios acerca del HIF-1 de pacientes de cuidados intensivos⁵¹.

Enfermedad cardíaca: En la insuficiencia cardíaca (IC), en un contexto parecido al que referimos en la enfermedad pulmonar crónica, existe aumento de ET-1, que si bien tiene un efecto inotrópico positivo, en el largo plazo favorece la hipertrofia miocárdica y la mala adaptación. En la isquemia miocárdica, se han detectado aumentos de VEGF, relacionados con estimulación hipóxica⁵². Los niveles de VEGF en leucocitos expuestos a hipoxia se correlacionan con el grado de formación de colaterales que induce la isquemia coronaria *in vivo*⁵³, por lo que una disminución de la expresión de HIF-1/VEGF inducidos por isquemia representaría un factor de riesgo no descrito previamente. En este sentido, es de prever que los desarrollos terapéuticos se dirigirán progresivamente a drogas que aumenten la activación de HIF-1 o inhiban su degradación, como por ejemplo el recientemente descrito PR39, péptido derivado de los macrófagos que induce angiogénesis miocárdica⁵⁴. Un segundo aspecto de interés es el del papel de HIF-1 en el pre-condicionamiento cardíaco ante la isquemia, en el que tiene un papel relevante la síntesis de nuevas proteínas en las primeras 24 h que siguen a un episodio agudo, con particular referencia a la NOS2 en miocardiocitos y células endoteliales⁵⁵. El HIF-1 es esencial en esta inducción.

La anemia es un factor patogénico relevante en la IC, cuyo origen está aún incompletamente dilucidado⁵⁶. La presencia de niveles elevados de EPO en pacientes con IC hace probable que HIF-1 esté estimulado, pero no se dispone aún de datos publicados en este sentido. Ac-

tualmente están en curso estudios, como el auspiciado por la Red Cardiovascular del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad, España) acerca de la patogenia de la anemia en la IC, que incluye medidas de HIF-1, pero del que no se han comunicado aún resultados.

Ictus: En modelos de oclusión vascular en ratas, se ha visto un incremento de la expresión de ARNm de HIF-1 en la zona de penumbra o tejido viable circundante al infarto⁵⁷. Esto coincide con la expresión de ARNm de otros genes transactivados por HIF-1, como enzimas glucolíticas y VEGF, que promueven la supervivencia neuronal⁵⁸.

Tabaco/Humo: Algunos de los mecanismos de carcinogénesis mediada por los hidrocarburos policíclicos aromáticos, encontrados en el humo del tabaco y en la contaminación urbana, así como la de las dioxinas, depende de su unión al receptor aril hidrocarburo (AhR) y su dimerización con ARNT, proteína que también dimeriza con HIF-1 α ⁵. Por otra parte, la exposición al humo del tabaco reduce la angiogénesis inducida por hipoxia, disminuyendo la expresión de VEGF y HIF-1 α , a través de una desestabilización de HIF-1 α por el monóxido de carbono (CO) producido en la combustión del cigarrillo. Esta supresión de genes angiogénicos puede ser determinante en los efectos del tabaco sobre la microcirculación, habiéndose propuesto terapéuticas basadas en la administración de vectores portadores de VEGF⁵⁹. Sin embargo, en un estudio en curso (Deudero JJP y González-Pacheco FR, datos no publicados) no se han encontrado diferencias en la respuesta de HIF-1 α hasta una semana después de haberse interrumpido el uso del tabaco en fumadores de más de 20 cigarrillos diarios.

Preeclampsia y crecimiento intrauterino retardado: En la preeclampsia, existe un fallo primario del trofoblasto para invadir el miometrio e inducir la remodelación de las arterias espirales uterinas durante la placentación. Esto provoca disminución de la perfusión de la unidad uteroplacentaria, condicionando hipoxia que activa HIF-1, promueve la expresión del factor de crecimiento de transformación β_3 (TGF β_3) y la síntesis del receptor-1 soluble del VEGF (sVEGFR1)⁶⁰, que bloquea al VEGF y empeora la perfusión de la placenta. En este contexto, son posibilidades terapéuticas la inhibición de HIF-1/TGF β_3 con oligonucleótidos antisentido, o la administración de VEGF.

En el crecimiento intrauterino retardado existe disminución de perfusión placentaria e hipoxia. IGFBP-1 (*insulin growth factor binding protein-1*) constituye un regulador negativo de IGF y éste está inducido por la presencia de sitios HREs en el promotor del gen que le da origen. IGFBP-1 está muy aumentado en sangre de cordón umbilical de neonatos con retraso de crecimiento⁶¹.

Sobredosis de fármacos: La hipoxia estimula, a través de HIF-1, la expresión de sub-unidades del citocromo p450, como CYP3A6, influyendo por lo tanto en la capacidad de neutralización y eliminación de drogas y pro-

ductos tóxicos y de desecho metabólico durante la hipoxia⁶².

Enfermedad inflamatoria intestinal: La sobreexpresión de HIF-1 protege el epitelio colónico ante la inflamación, mientras que la ausencia de HIF-1 produce el efecto contrario⁶³.

Patología retiniana: En modelos animales, se ha observado que la exposición a hiperoxia en el período neonatal, determina regresión vascular e isquemia, fenómenos similares a los descritos en la retinopatía de la prematuridad y que se relacionan con alteraciones de la expresión génica. Del mismo modo, se considera crucial el papel de péptidos como el VEGF en la neovascularización retiniana de la diabetes mellitus y otras retinopatías proliferativas⁶⁴⁻⁶⁶. Este es uno de los campos en los que el progreso terapéutico puede ser más acelerado, ya sea mediante incremento o inhibición de HIF-1 y genes dependientes.

Heridas: El VEGF aumenta localmente durante la curación de heridas, involucrando un mecanismo mediado por ROS⁶⁷. En este contexto, la sobre-activación de la vía de HIF-1 puede ser útil para incrementar la vascularización, permeabilidad vascular y cicatrización en heridas donde el VEGF no haya aumentado suficientemente.

La presente no es una revisión exhaustiva de los efectos de HIF-1, pero intenta dar una visión de conjunto de las circunstancias tan diversas en que este factor transcripcional se halla implicado y de las extraordinarias posibilidades terapéuticas que ofrecen su bloqueo o estimulación. En este sentido, HIF-1 representa el eje de un mecanismo central con múltiples conexiones, por lo que la intervención sobre el mismo puede ser un instrumento esencial en el control de múltiples situaciones patológicas.

Agradecimientos: Al Fondo de Investigación Sanitaria (FIS:PI030888), Red Cardiovascular C03/01 (RECAVA, Instituto de Salud Carlos III), Comunidad Autónoma de Madrid (CAM: 08.3/0008.3/2001.3), Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica (IRSIN), Fundación Conchita Rábago.

Referencias

1. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604-13.
2. Liu LX, Lu H, Luo Y, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 908-14.
3. Semenza GL, Neifelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5680-4.
4. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; 270: 1230-7.
5. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510-4.
6. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, et al. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 1997; 272: 19253-60.
7. Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, et al. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 1991; 252: 954-8.
8. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4304-8.
9. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292: 468-72.
10. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; 295: 858-61.
11. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7987-92.
12. Katschinski DM, Le L, Heinrich D, et al. Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1alpha is dependent on heat shock protein-90 activity. *J Biol Chem* 2002; 277: 9262-7.
13. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, et al. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 29936-44.
14. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988; 242: 1412-5.
15. Maxwell P, Salnikow K. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 29-35.
16. Michiels C, Minet E, Mottet D, Raes M. Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1231-42.
17. Zelzer E, Levy Y, Kahana C, et al. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J* 1998; 17: 5085-94.
18. Feldser D, Agani F, Iyer NV, et al. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999; 59: 3915-8.
19. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999; 94: 1561-7.
20. Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; 60: 1541-5.
21. Goralach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, et al. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001; 89: 47-54.
22. Spinella F, Rosano L, Di C, et al. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 27850-5.
23. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, et al. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor

- 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3995-4004.
24. González-Pacheco FR, Deudero JJP, De Solis AJ, et al. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) incrementa la síntesis de la sub-unidad alfa del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1alfa) en condiciones de normoxia. XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Nefrología (SEN). Oct 2-5 2004, Santa Cruz de Tenerife, España.
 25. Deudero JJP, González-Pacheco FR, De Solis AJ, et al. VEGF increases HIF-1 levels by a superoxide-mediated mechanism. A joint meeting of the Oxygen Club of California and the University of Turín. Sept 7-10, 2005; Alba, Italy.
 26. Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 1998; 274: L212-9.
 27. Graven KK, Yu Q, Pan D, et al. Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1447: 208-18.
 28. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996; 271: 32529-37.
 29. Gleadow JM, Ratcliffe PJ. Induction of hypoxia-inducible factor-1, erythropoietin, vascular endothelial growth factor, and glucose transporter-1 by hypoxia: evidence against a regulatory role for Src kinase. *Blood* 1997; 89: 503-9.
 30. Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 1998; 274: L212-9.
 31. Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest* 2000; 105: 577-87.
 32. Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 1997; 272: 20055-62.
 33. Yamashita K, Discher DJ, Hu J, et al. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J Biol Chem* 2001; 276: 12645-53.
 34. Eickelberg O, Seebach F, Riordan M, et al. Functional activation of heat shock factor and hypoxia-inducible factor in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2094-101.
 35. Mabeesh NJ, Post DE, Willard MT, et al. Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha protein via the proteasome pathway in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 2478-82.
 36. Cai Z, Manalo DJ, Wei G et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2003; 108: 79-85.
 37. Semenza GL. Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer Cell* 2004; 5: 405-6.
 38. Hoppeler H, Vogt M, Weibel ER, Fluck M. Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Exp Physiol* 2003; 88: 109-19.
 39. Semenza GL. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res* 2000; 1: 159-62.
 40. Schulz R, Hummel C, Heinemann S, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 67-70.
 41. Mason SD, Howlett RA, Kim MJ, et al. Loss of skeletal muscle HIF-1alpha results in altered exercise endurance. *PLoS Biol* 2004; 2: e288.
 42. Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30: 465-8.
 43. Kanno H, Kondo K, Ito S, et al. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic central nervous system hemangioblastomas. *Cancer Res* 1994; 54: 4845-7.
 44. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 1994; 7: 85-90.
 45. Wellmann S, Guschmann M, Griethe W, et al. Activation of the HIF pathway in childhood ALL, prognostic implications of VEGF. *Leukemia* 2004; 18: 926-33.
 46. Hierholzer C, Billiar TR. Molecular mechanisms in the early phase of hemorrhagic shock. *Langenbecks Arch Surg* 2001; 386: 302-8.
 47. Hierholzer C, Harbrecht BG, Billiar TR, Tweardy DJ. Hypoxia-inducible factor-1 activation and cyclo-oxygenase-2 induction are early reperfusion-independent inflammatory events in hemorrhagic shock. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001; 121: 219-22.
 48. Eckardt KU. Anaemia in end-stage renal disease: pathophysiological considerations. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16 Suppl 7: 2-8.
 49. Wiesener MS, Seyfarth M, Warnecke C, et al. Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel-Lindau gene in a renal cell carcinoma. *Blood* 2002; 99: 3562-5.
 50. Poellinger L, Johnson RS. HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14: 81-5.
 51. Fink MP. Pathophysiology of intensive care unit-acquired anemia. *Crit Care* 2004; 8 (Suppl 2): S9-10.
 52. Kakinuma Y, Miyauchi T, Yuki K, et al. Novel molecular mechanism of increased myocardial endothelin-1 expression in the failing heart involving the transcriptional factor hypoxia-inducible factor-1alpha induced for impaired myocardial energy metabolism. *Circulation* 2001; 103: 2387-94.
 53. Schultz A, Lavie L, Hochberg I, et al. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* 1999; 100: 547-52.
 54. Li J, Post M, Volk R, et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 49-55.
 55. Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 1998; 274: L212-19.
 56. Justo S, Gil P, González-Pacheco FR, Caramelo C. Anemia en la insuficiencia cardíaca: mecanismos patogénicos. *Rev Esp Cardiol* (En prensa, 2006).
 57. Bergeron M, Yu AY, Solway KE, et al. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 4159-70.
 58. Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 2000; 156: 965-76.
 59. Michaud SE, Menard C, Guy LG, et al. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke

- exposure: impairment of the HIF-1alpha/VEGF pathway. *FASEB J* 2003; 17: 1150-2.
60. Vuorela P, Helske S, Hornig C, et al. Amniotic fluid soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 353-7.
 61. Tazuke SI, Mazure NM, Sugawara J, et al. Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10188-93.
 62. Fradette C, Du SP. Effect of hypoxia on cytochrome P450 activity and expression. *Curr Drug Metab* 2004; 5: 257-71.
 63. Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, et al. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest* 2004; 114: 1098-106.
 64. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77: 527-43.
 65. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 905-9.
 66. Ozaki H, Yu AY, Della N, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 182-9.
 67. Sen CK, Khanna S, Babior BM, et al. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J Biol Chem* 2002; 277: 33284-90.

Succès et fragilité des antibiotiques

Mais, s'il fallait dater l'acte de naissance de l'antibiothérapie, on pourrait se risquer à proposer la date du 16 juillet 1877. Ce jour-là à l'Académie des Sciences, Louis Pasteur signait avec Jules François Joubert une longue communication sur le vibron septique et la bactérie charbonneuse. Ils démontraient ainsi l'antagonisme naturel de ces deux espèces bactériennes: "Le développement de la bactérie ne peut avoir lieu que de manière très pénible quand elle est en présence d'autres organismes microscopiques [...]. Chez les êtres inférieurs plus que dans les grandes espèces animales et végétales, la vie empêche la vie". Pasteur avait démontré que la croissance d'une espèce bactérienne pouvait être inhibée par certaines autres bactéries.

Éxito y fragilidad de los antibióticos

[...] Pero, si hubiera que dar la fecha del nacimiento de la antibióticoterapia, se podría arriesgar a proponer el 16 de julio de 1877. Ese día, en la Academia de Ciencias, Louis Pasteur presentó con Jules François Joubert una larga comunicación sobre el vibrión séptico (*Clostridium perfringens*) y la bacteria carbonosa (*Bacillus anthracis*). Ellos mostraban así el antagonismo natural de estas especies bacterianas: "La bacteria sólo puede desarrollar muy difícilmente cuando está en presencia de otros organismos microscópicos [...]. En los seres inferiores más que en las grandes especies animales y vegetales, la vida impide la vida". Pasteur había demostrado que el crecimiento de una especie bacteriana podía ser inhibida por ciertas otras bacterias.

François Chast

Histoire contemporaine des médicaments. Paris: La Découverte/Poche, 1995, p 238